DAS TROCKENCHEMIE - SYSTEM

KODAK EKTACHEM DT 60

Klinische Studie über seine Verwendbarkeit für die

Labordiagnostik bei Hund, Katze und Pferd

ULRIKE SCHOLZ

1988

Disbui. München
1988

UNIV.
LIBRARY
KIEL

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554827_0036

Aus der Medizinischen Tierklinik
Lehrstuhl für Innere Krankheiten des Pferdes und der kleinen Haustiere sowie für Gerichtliche Tiermedizin
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Wilfried Kraft

Das Trockenchemie - System KODAK EKTACHEM DT 60

Klinische Studie über seine Verwendbarkeit für die Labordiagnostik bei Hund, Katze und Pferd

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Ulrike Scholz
aus
Traunstein

München 1988

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Prof. Dr. W. Kraft

Korreferent: Prof. Dr. M. Merkenschlager

Tag der Promotion: 29. Juli 1988

MEINEN ELTERN

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATUR	4
1.	Trockenchemie	4
1.1.	Prinzip	4
1.2.	Geschichtliche Entwicklung	5
1.3.	Trockenreagenzträger	10
2.	Das KODAK EKTACHEM DT60 Analysensystem	13
2.1.	Das Analysengerät	13
2.1.1.	DT60 Analyzer	13
2.1.2.	DTE - Modul	18
2.1.3.	DTSC - Modul	21
2.2.	Das Analysenplättchen	23
2.2.1.	Verteilerschicht	25
2.2.2.	Reagenzienschicht	28
III.	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	29
1.	Material und Methoden	29
1.1.	Material	29
1.1.1.	Proben	29
1.1.2.	Tiere	29
1.1.3.	Geräte	31

		Seite
1.2.	Methoden	33
1.2.1.	Qualitätskontrolle	33
1.2.2.	Enzym- und Substratbestimmungen	36
	Aspartat-Aminotransferase	37
	Alanin-Aminotransferase	43
	Creatin-Kinase	48
	Alkalische Phosphatase	54
	Lactat-Dehydrogenase	58
	Gamma-Glutamyltransferase	62
	α-Amylase	67
	Gesamt-Bilirubin	73
	Glucose	80
	Harnstoff	86
	Gesamt-Eiweiß	92
	Creatinin	98
1.2.3.	Elektrolytbestimmungen	107
	Natrium und Kalium	108
1.2.4.	Serumverdünnungen	114
1.2.5.	Statistische Auswertung	115
2.	Ergebnisse	117
2.1.	Qualitätskontrolle	117
2.1.1.	Präzision in der Serie	117
2.1.2.	Präzision von Tag zu Tag	121
2.2.	Methodenvergleich	126
2.2.1.	Meßdaten beim Hund	127
2.2.2.	Meßdaten bei der Katze	150
2.2.3.	Meßdaten beim Pferd	173
2.2.4.	Die untersuchten Parameter im tierartlichen Vergleich	196

		Seite
IV.	DISKUSSION	199
V.	ZUSAMMENFASSUNG	210
	SUMMARY	211
VI.	LITERATURVERZEICHNIS	212
	Danksagung	
	Lebenslauf	

A B K Ü R Z U N G S V E R Z E I C H N I S

a	Achsenabschnitt der y-Achse
ADP	Adenosindiphosphat
ALT	Alanin-Aminotransferase
AMP	Adenosinmonophosphat
AMYL	Amylase
AP, ALKP	Alkalische Phosphatase
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
b	Steigung der Regressionsgeraden
CK	Creatin-Kinase
CREA	Creatinin
DPD	2,5-Dichlorphenyl-Diazoniumsalz
EC	Enzyme Code
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
GGT	Gamma-Glutamyltransferase
GLDH	Glutamat-Dehydrogenase
GLU	Glucose
G6P-DH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
LDH	Lactat-Dehydrogenase
n	Anzahl der Proben
$NAD(H_2)$	Nicotinamid-adenin-dinucleotid(reduziert)
$NADP(H_2)$	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat (reduziert)
NH_3	Ammoniak
PAP	Phenol-Aminophenazon
PNP	p-Nitrophenol
r	Korrelationskoeffizient

s	Standardabweichung
Sy.x	Standardfehler der Schätzung
TBIL	Gesamt(Total)-Bilirubin
TP	Gesamt(Total)-Protein
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Internationale Einheit der Enzymaktivität
UREA	Harnstoff
VK	Variationskoeffizient
$\bar{x}$	Mittelwert

UNIV. LEIDEN

I. E I N L E I T U N G

Die Labordiagnostik hat in den letzten Jahren auch in der Tiermedizin zunehmend an Bedeutung gewonnen. Trotzdem ist die Zahl der Untersuchungen, die im eigenen Labor des Praktikers sowie kleinerer Kliniken durchgeführt werden, eher zurückgegangen. Hauptsächlich schnelle Untersuchungsmethoden, wie die qualitativen und semiquantitativen Blutzucker- und Blutharnstoffbestimmungen mittels Teststreifen und die Untersuchungen mit Harnteststreifen, gelangen zum Einsatz, die übrigen - besonders die photometrischen Bestimmungen - werden aus Gründen des personellen Zeitaufwandes, der Qualitätskontrollen und des Reagenzienverfalls meist an Fremdlabors vergeben, die ungleich kostengünstiger arbeiten können[47]. Aus diesen wirtschaftlichen Überlegungen heraus nimmt man auch die erheblichen Nachteile dieser Fremdlabors in Kauf, einmal den oft beträchtlichen Zeitverlust bis zum Erhalt der Ergebnisse und damit den Verzicht auf die Präsenzdiagnostik, d.h. die unmittelbare zeitliche Verknüpfung von Befunden aus Anamnese, klinischer Untersuchung und Labordiagnostik, die ein sofortiges Einsetzen der entsprechenden Therapie erlauben würde[82], zum anderen sind diese Labordienste meist rein humanmedizinisch orientiert, und weder die Untersuchungsmethoden, die Eichung der Geräte, noch das Fachpersonal sind für die Untersuchung von Tierproben geeignet.

Dank neuer technologischer Fortschritte auf dem Gebiet der klinischen Chemie gibt es seit wenigen Jahren neue Analysengeräte auf dem Markt, die - auf der Grundlage trockenchemischer Reagenzträger verbunden mit reflexionsphotometrischer Messung - die quantitative Bestimmung einer Reihe von Parametern meist aus dem Blut (Vollblut, Serum, Plasma), gelegentlich auch aus Harn und Liquor ermöglichen. Da jedoch auch diese Apparate ursprünglich für die Humanmedizin entwickelt wurden, können sie nicht vorbehaltlos für die Tiermedizin übernommen werden.

Ziel meiner Arbeit war es nun, eines dieser neuen "Trockenchemie"-Geräte, den KODAK EKTACHEM DT6o Analyzer, auf seine Verwendbarkeit in der tiermedizinischen Labordiagnostik zu testen.

Der Untersuchungszeitraum erstreckte sich über sechs Monate, von Anfang April bis Ende September 1987. Zur Untersuchung gelangten die Seren von Hunden, Katzen und Pferden, die an der I.Medizinischen Tierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München als Patienten vorgestellt wurden.

Aus der relativ breiten Palette möglicher Parameter, die sich mit dem DT6o-Analysengerät bestimmen lassen, wurden diejenigen ausgewählt, die in der tiermedizinischen Labordiagnostik die größte Aussagekraft besitzen und somit am häufigsten untersucht werden müssen. Es waren dies: Glukose, Harnstoff, Gesamtbilirubin, Gesamteiweiß, Kreatinin; die Enzyme Amylase (nur bei Hund und Katze), ALT, CK, AP, AST, LDH, GGT (die letzten

drei nur beim Pferd); sowie die Elektrolyte Na^+ und K^+.

Die Beurteilung der Meßergebnisse erfolgte gegen mit anerkannten Referenzmethoden ermittelte Vergleichswerte. Ferner wurden Qualitätskontrollen bezüglich Richtigkeit, Präzision in der Serie und Präzision von Tag zu Tag durchgeführt.

II. L I T E R A T U R

1. TROCKENCHEMIE

1.1. P r i n z i p

Eine Behauptung von Stähler (1983) sei an den Anfang gestellt: "Trockenchemie, die gibt es gar nicht!" Denn die "Trockenchemie" stabilisiert zwar alle für eine klinisch-chemische Analyse notwendigen Reaktionskomponenten - Indikatoren, Enzyme, Hilfsreagenzien - durch Trocknung der vorgefertigten, eingewogenen Lösungsmengen auf Papier- oder Filmmaterial als Träger, aber der zu untersuchende Reaktant liegt in wäßriger Phase vor. Erst durch dessen Zugabe in Form einer definierten Menge der ggf. vorverdünnten Probe (Serum, Plasma, Vollblut, Urin, Liquor) werden die Reagenzien gelöst und zur Reaktion gebracht[82,89]. Ohne den Lösungsvermittler Wasser findet also keine chemische Reaktion statt, weshalb man besser von Trockenreagenzträgern sprechen sollte[89]. In den so entstehenden Arbeitslösungen laufen dann dieselben chemischen Reaktionen ab, die wir bereits aus der klassischen "Naßchemie" kennen. Die anschließende Ermittlung des Ergebnisses kann visuell oder apparativ erfolgen, wobei nach einer jeweils festgesetzten Zeit die Änderung der optischen oder elektrischen Eigenschaften des

Reagenzträgers bestimmt wird[45,94].
Obwohl der Begriff "Trockenchemie" also erwiesenermaßen falsch ist, hat er sich doch als Bezeichnung für die neue Technik der quantitativen klinisch-chemischen Analyse mittels trockener Reagenzträger durchgesetzt, nicht zuletzt wohl deswegen, weil er eine relativ einfache und anschauliche Abgrenzung von den konventionellen naßchemischen Verfahren ermöglicht. Aus diesem Grunde soll er auch in dieser Arbeit beibehalten werden.

Allerdings so neu, wie es vielleicht scheinen mag, ist die Trockenchemie gar nicht. Ihre Wurzeln reichen zumindest bis ins letzte Jahrhundert zurück. Auf die Entwicklungsgeschichte, von diesen Anfängen bis hin zu den heutigen ausgereiften Trockenchemiesystemen, wird im folgenden Kapitel eingegangen.

1.2. Geschichtliche Entwicklung

Eines der ältesten Beispiele für die Anwendung schneller, einfacher Testverfahren auf Trockenchemiebasis ist das Lackmuspapier, das bereits im 19. Jahrhundert als Säure-Basen-Indikator verwendet wurde[58]. Lackmus, ein natürlicher Farbstoff, wird durch Vergärung verschiedener Flechten - vor allem Rocella-Arten - nach Zusatz von Kalk, Ammonium- und Kaliumcarbonat gewonnen. Mit neutraler Lackmustinktur (einem Wasser-Alkohol-Extrakt) getränktes violettes Reagenzpapier färbt sich durch verdünnte Säuren oder Basen rot bzw. blau.

Auch die erste qualitative Analyse von Glucose im Urin mit trockenen Reagenzträgern ist schon historisch. Bereits 1850 beschrieb Maumené eine Methode mit Teststreifen, gewoben aus weißer Merinowolle[67].

In den 30er Jahren dieses Jahrhunderts entwickelte Feigl eine Tüpfeltechnik, bei der das jeweilige Reagenz und die Probe auf einem Filterpapier vereint wurden und unter Farbentwicklung miteinander reagierten. Die Farbintensität stellte ein Maß für die Konzentration des gesuchten Analyten dar[58].

In der industriellen Chemie waren Teststreifen schon längst weit verbreitet, bevor sie Ende der fünfziger Jahre als diagnostische Schnelltests auch in der klinischen Chemie Eingang fanden. Entscheidende Anstöße für diese Entwicklung lieferte - nach der Einführung des Insulins in die Diabetesmellitus-Behandlung um 1922 - das wachsende Bedürfnis, eine rasche, einfache und zuverlässige Kontrolle der Glucose im Urin - möglichst im Selbsttest - durchführen zu können.
Zunächst gab es dafür Reagenztabletten von Compton/Treneer, genannt Clinitest®, die auf dem Prinzip der Glucoseoxidation durch blaues Kupfersulfat beruhten und im Urin anwesende Glucose durch Farbwechsel nach orange anzeigten. Dieser Test war der erste, der in größerem Umfang zur Diabetesselbstkontrolle eingesetzt wurde, und er war auch das erste klinische Trockenreagenzsystem. Ein zweites ähnliches System war Acetest® aus dem Miles-Ames-Forschungslaboratorium, das der Erkennung drohender Ketoacidose diente. Die weißen Reagenztabletten, die u.a. Nitroprussidnatrium enthielten, verfärbten

sich sofort violett, sobald ketonkörperhaltiger Urin aufgetropft wurde. Auch heute nach 40 Jahren wird Acetest® immer noch weltweit verwendet[41].

Im Jahre 1956 entwickelten Free und Comer einen ersten enzymatischen Farbtest für Glucose im Urin, basierend auf den spezifischen Glucoseoxidase- und Peroxidasereaktionen, und auch die Durchführung der Tests wurde vereinfacht. Man benutzte nun Reagenzstreifen, wie Clinistix® (Ames), TesTape® (Lilly) oder Glukotest® (Boehringer Mannheim), die nur noch kurze Zeit in den Harn eingetaucht werden mußten und danach abgelesen werden konnten[41]. Dies erweiterte ihre Verwendung durch die Diabetiker selbst um ein Vielfaches und bildete auch die Basis dafür, daß in der Folgezeit immer neue Teststreifenverfahren zur Bestimmung von Parametern, die für die Harndiagnostik erforderlich sind, entstanden. Bei Boehringer Mannheim waren dies beispielsweise pH, Protein (1964); Nitrit (1967); Urobilinogen (1979); Keton (1973); Bilirubin, Blut (1974) und Leukozyten (1979), die inzwischen auch alle nebeneinander mit einem einzigen Teststreifen untersucht werden können (= Combur 9 Test®)[22].

Die Anwendung der Trockenchemie blieb aber nicht auf Harnuntersuchungen beschränkt, sondern man begann auch bald damit, Blutparameter zu bestimmen. 1964 wurde mit Dextrostix® (Ames) - Reagenzstreifen ein erster schnell verfügbarer Test für Blutglucose vorgestellt, der nach dem gleichen enzymatischen Prinzip mit anschließender Farbreaktion wie bei der Harnglucosebestimmung arbeitete[41].

Erlaubten die Teststreifenmethoden anfangs nur rein qualitative Nachweise einzelner Harn- bzw. Blutbestandteile durch auftretende Farbreaktionen, so entwickelten sie sich schrittweise - über die Verwendung von mehreren Testfeldern unterschiedlicher Empfindlichkeit und den Vergleich mit Farbskalen - zu halbquantitativen Schätzungen. Dennoch blieb diese visuelle Testauswertung unbefriedigend, da sie von zu vielen Faktoren wie Farbempfinden des jeweiligen Untersuchers, Augenermüdung, schlechte Lichtverhältnisse etc. beeinflußbar ist, die zu Fehlinterpretationen der Ergebnisse führen können. Der nächste Schritt war daher die Automatisierung des Ablesevorganges.

Als Meßtechnik wählte man die Reflometrie, die mittels definierter Wellenlänge reflexionsphotometrisch die Intensitätsänderung von trockenchemischen Reagenzträgern mißt[82]. Damit wurde auch der Weg in Richtung quantitative Analyse beschritten. Die ersten Reflektometer kamen Ende der sechziger Jahre auf den Markt. Sie waren noch schwer und unhandlich und erlaubten auch nur semiquantitative Bestimmungen. Wiederum war es die Glucose, deren Konzentration auf dem Teststreifen zuerst reflektometrisch gemessen wurde. Durch technologische Weiterentwicklung wurden die Geräte immer kleiner, leichter, einfacher zu bedienen und auch preiswerter. Ihre Meßgenauigkeit nahm zu, und wenngleich sie anfangs fast ausschließlich im Notfalllabor eingesetzt wurden, sind sie inzwischen weit verbreitet in der Selbstkontrolle des Diabetikers. Die meisten der heute erhältlichen Modelle führen

die Glucosebestimmung aus Vollblut durch (z.B. Dextrometer® und Glucometer® der Fa. Ames-Miles; Reflomat® und Reflochek® der Fa. Boehringer Mannheim u.a.).

Nachdem die Messung der Reflexion - meist mittels einer Ulbricht-Kugel - inzwischen quantitative Bestimmungen möglich machte, war der Einsatz von Mikroelektronik der nächste Schritt. Sie trug wesentlich zur Vereinfachung und teilweise zur Reduzierung von Arbeitsschritten bei. Da die in die Meßgeräte eingebauten Mikrocomputer in der Lage sind, eine Vielzahl von Daten zu speichern, machen sie u.a. alle manuellen Berechnungen überflüssig, übernehmen Steuerungs- und Kontrollaufgaben und sorgen für eine automatische Ergebnisausgabe über digitale Anzeige oder Drucker.

Diese Verbindung von Trockenreagenzträgern mit Reflexionsphotometrie und Mikroprozessortechnik führte zu dem, was wir heute als Trockenchemie im engeren Sinne bezeichnen.

Seit Ende der siebziger und Anfang der achziger Jahre steht nun eine neue Generation ausgereifter trockenchemischer Systeme zur Verfügung, die es erlaubt, eine noch wachsende Anzahl von Parametern meist aus Serum und Plasma, aber auch aus Vollblut, Urin oder Liquor cerebrospinalis zu bestimmen. Zu erwähnen wären hier das Reflotron®- (Boehringer Mannheim), das Seralyzer®- (Ames Miles), das Stratus®- (Dade) und das EKTACHEM® - System (Eastman Kodak).

1.3. Trockenreagenzträger

Die Entwicklung verschiedener Herstellungstechniken hat zu zwei Haupttypen von Trockenreagenzträgern geführt:

a) Imprägnierte Fasern

In diese Gruppe gehören wohl die meisten der heute erhältlichen Teststreifen. Die Reagenzien werden auf Cellulosefasern als Träger aufgezogen, indem die Papiermatrix mit Reagenzlösungen getränkt und anschließend getrocknet wird. Bei einer reflexionsphotometrischen Messung dient diese Matrix selbst als reflektierende Schicht. Die Papiermatrizes, die normalerweise verwendet werden, bestehen aus reiner Cellulose von gleichmäßiger Faserdichte und definierter Stärke.

Nach dem Trocknen verbleiben nur Spuren von Wasser in den Teststreifen. Dadurch wird das System sehr stabil und stellt keine besonderen Anforderungen an Verpackung und Aufbewahrung . Auch die chemischen Reaktionen auf den Teststreifen laufen weitgehend unabhängig von der umgebenden Raumtemperatur ab[82]. Zu beachten ist aber, daß das geforderte Probenvolumen, besonders bei Endpunktreaktionen, genau eingehalten wird[58].

b) Mehrschichtenfilm

Bei dieser Technik werden die Reagenzien wie bei Farbfilmen in mehreren dünnen Schichten auf einen Träger aufgebracht. Dieser besteht gewöhnlich aus Plastik oder plastikahnlichem Material, das transparent oder reflektierend

sein kann, je nachdem, ob die Reflexionsmessung von der Ober- oder von der Unterseite des Testplättchens oder-streifens her erfolgt. Eingestrahltes Licht, das nicht von der Reagenzienschicht absorbiert wird, soll von der reflektierenden Schicht - in die meist noch Pigmente wie TiO_2 oder $BaSO_4$ zur Reflexionsverstärkung eingelagert sind - auf ein Detektionssystem zurückgeworfen werden.
Die Reagenzienschicht kann aus mehreren Filmlagen bestehen, von denen jede einen Teil der chemischen Substanzen enthält, die für den jeweiligen Reaktionsablauf benötigt werden. Die Filmmatrizes bestehen im allgemeinen aus Polymeren wie Gelatine, Agarose, Alginat, Polyvinylalkohol, Polyvinylpyrrolidon und Celluloseacetat. Die pH-Abhängigkeit dieser Matrixpolymere erfordert Bestimmungsmethoden, deren Reaktionen ohne starke pH-Änderungen ablaufen. Die exakte Einhaltung des Probenvolumens spielt eine weit geringere Rolle als bei den imprägnierten Fasern (siehe dazu 2.2.). Das trotz Trocknung in den Polymermatrizes verbleibende Restwasser macht es nötig, diese trockenchemischen Reagenzträger luft- und lichtundurchlässig (eingeschweißt) und kühl aufzubewahren[58]. Entwickelt wurde diese Mehrschichten-Technologie von der Kodak Company.

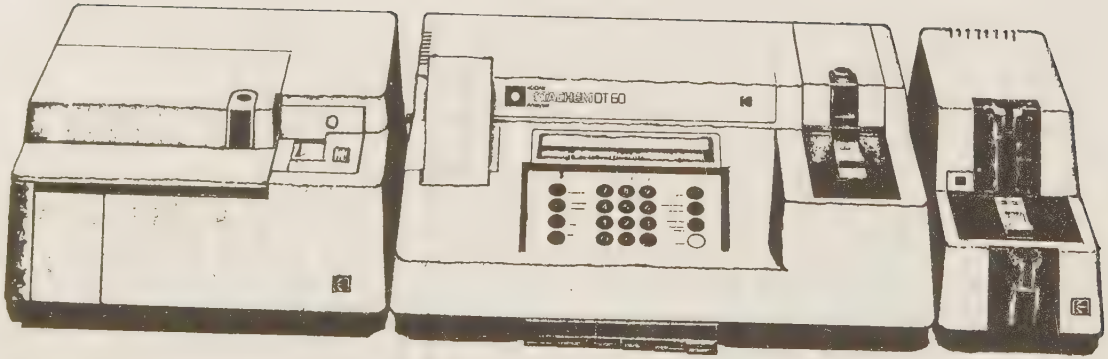


Abb. 1 Das KODAK EKTACHEM DT 60 Analysengerät
von links: DTSC-Modul (Enzymbestimmungen)
DT60 Analyzer (Substratbestimmungen)
DTE-Modul (Elektrolytbestimmungen)

2. DAS KODAK EKTACHEM DT60 ANALYSENSYSTEM

2.1. Das Analysengerät

Das getestete Gerät besteht aus drei Einheiten,
dem KODAK EKTACHEM DT60 ANALYZER,
dem KODAK EKTACHEM DTE-MODUL und
dem KODAK EKTACHEM DTSC-MODUL.
Der mit einem Mikrocomputer ausgestattete DT60 Analyzer dient als Grundgerät, von dem aus die beiden angeschlossenen Zusatzgeräte gesteuert werden. Den Dialog mit diesem Mikrocomputer ermöglicht ein Tastenfeld mit digitaler Anzeige. Über das Tastenfeld - zum Schutz vor auslaufenden Flüssigkeiten und zur leichteren Reinigung mit einer Folie überzogen, auf der Druckpunkte markiert sind, - werden Daten und Befehle an den Mikrocomputer des Analyzers eingegeben, wohingegen Meldungen und Ergebnisse von diesem auf dem Flüssigkristall-Anzeigefeld aufscheinen oder durch den eingebauten Thermodrucker ausgedruckt werden, so daß ein schriftliches Protokoll der durchgeführten Arbeiten und erzielten Ergebnisse vorliegt[54]. (Abb. 1)

2.1.1. DT60 ANALYZER

Im DT60-Grundgerät werden Substrate mit einem

Präzisionsphotometer gemessen. Ein auf Raumtemperatur vorgewärmtes kolorimetrisches Plättchen wird in vorgeschriebener Weise in die Ladestation eingelegt und mit dem Plättchentransporthebel in die Betropfungsstation eingeschoben, wo durch einen Strichcodeleser die Identifikation der Test- und Generationsnummer des Analysenplättchens für den Mikrocomputer erfolgt. Die Testbezeichnung erscheint auf dem Anzeigefeld.
Mit der EKTACHEM DT-Pipette, einer batteriebetriebenen Einzelspitzenpipette mit Elektromotor, werden genau 10 µl der zu untersuchenden Probe angesaugt und - nach Einführen der Pipette in die Pipettenstation - an das Plättchen in der Betropfungsstation abgegeben. Ein optischer Tropfendetektor schaltet die im Analyzer eingebaute Schaltuhr ein und prüft, ob das Plättchen betropft wurde, bevor es automatisch von der Vorwärmkammer in den Inkubator transportiert wird, wo es etwa 5 Minuten lang bei 37 Grad Celsius verbleibt. Bereits nach ungefähr 30 Sekunden ist der Analyzer zur Aufnahme des nächsten kolorimetrischen Plättchens bereit, während das vorherige weiter inkubiert wird. Bis zu sechs übereinander gestapelte Analysenplättchen faßt der Inkubator, wobei jedes oben auf den Stapel gelegt und unten ausgeworfen wird[54]. Alle Tests können in beliebiger Reihenfolge durchgeführt werden, lediglich die Bestimmungen von Creatinin und Ammoniak bilden eine Ausnahme. Befindet sich nämlich einer dieser beiden Tests in Bearbeitung, dürfen entweder nur weitere Creatinin- oder Ammoniakplättchen eingegeben werden oder es muß dessen Beendigung abgewartet werden, bevor

man eine andere Testart wählt, da es anderenfalls zu Verfälschungen der Ergebnisse kommen könnte.

Nach Ablauf der Inkubationszeit transportiert das untere Stapelgestänge das Analysenplättchen von der Unterseite des Plättchenstapels in die Meßstation. Bevor dieses Gestänge wieder eingezogen wird, werden noch Weiß-Schwarz-Bezugswerte gemessen, die später zur Erstellung des Ergebnisses benötigt werden. Die Messungen erfolgen mittels eines wartungsfreien faseroptischen Reflexionssystems (FORS)[54]. Das FORS besteht aus feinen Glasfasern, die in vier optische Bündel unterteilt sind. Drei dieser Lichtleiterbündel sind mit je einer Leuchtdiode (LED) verbunden, deren Emissionen bei unterschiedlichen Wellenlängen liegen. So beträgt die Wellenlänge bei der roten LED 660 nm, bei der gelben 605 nm und bei der grünen 555 nm. Das vierte Bündel ist mit einer Fotodiode (Detektor) verbunden. Fällt nun das Analysenplättchen auf den FORS-Kopf in der Meßstation, schaltet der Computer, abhängig vom Plättchentyp, die entsprechende Leuchtdiode an und nimmt jeweils drei Messungen an der Indikatorschicht des Plättchens, sowie zuvor schon an einer weißen und einer schwarzen Referenzfläche vor[93]. Dabei wird das Licht faseroptisch auf die Unterseite des transparenten Plättchenträgers geworfen und von der lichtundurchlässigen Verteilerschicht - nach Passieren der Reagenzzone - auf den Fotodetektor reflektiert. (Abb. 2u. 3) Grundlage der Substratbestimmung ist der hydrolytische oder oxidative Abbau der entsprechenden Verbindung mit Hilfe von Enzymen sowie der Nachweis des entstehenden Wasserstoffperoxyds bzw. des Ammoniaks mittels verschiedener Indikatorreak-

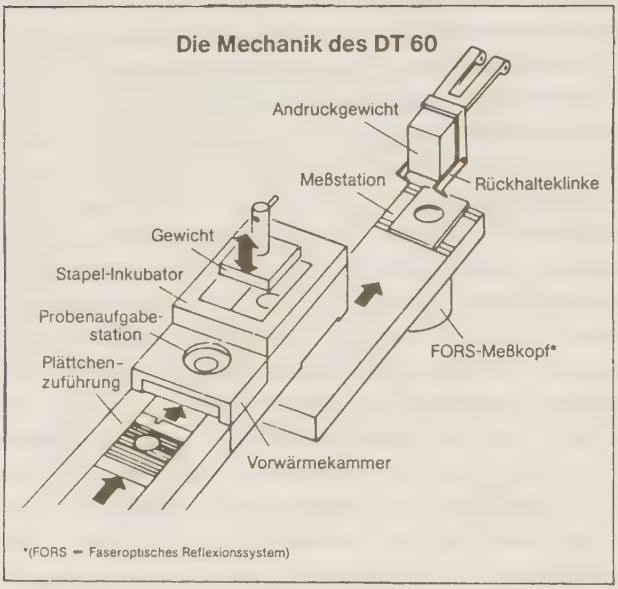


Abb.2 Die Mechanik des DT 60 Analyzers
(aus Ronchetti et al., 1984)

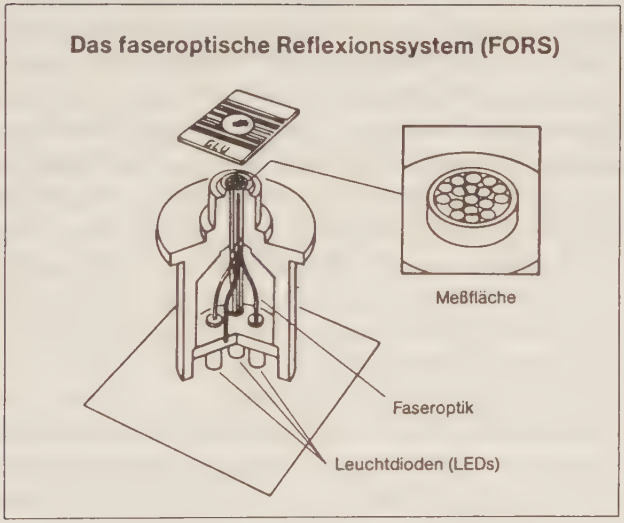


Abb.3 Das faseroptische Reflexionssystem
(aus Ronchetti et al., 1984)

tionen[84]. Gemessen wird die Farbintensität der jeweiligen Indikatorschicht nach Ablauf der chemischen Reaktion (Endpunktbestimmung). Anschließend errechnet der Mikrocomputer die Konzentration der Probe anhand der jeweiligen Mittelwerte aus den Reflexions- und Weiß-Schwarz-Bezugswerten kombiniert mit einem Kalibrationsmodell und den gespeicherten Kalibrationsparametern[54].
Nachdem die Messungen abgeschlossen sind, verbleibt das Analysenplättchen in der Meßstation, bis es vom nächsten Plättchen in einen Behälter an der Rückseite des Analyzers geschoben wird. Das Analysenergebnis wird vom Thermodrucker entweder in konventionellen oder in SI-Einheiten ausgedruckt, evtl. zusammen mit einer vorher eingegebenen Patientennummer und dem Datum[73].

2.1.2. DTE - MODUL

Im DTE-Modul werden Elektrolytkonzentrationen mit einem hochohmigen Potentiometer durch direkte Potentiometrie ermittelt. Jedes Testplättchen trägt zwei ionensensitive Elektroden, eine für die zu analysierende Patientenprobe und eine für die Referenzlösung mit bekannter Elektrolytkonzentration. Für die elektrische Verbindung sorgt eine Papierbrücke. Plättcheneingabe und -identifikation in der Betropfungsstation erfolgen ähnlich wie beim DT60 Analyzer. Zur Plättchenbetropfung wird die KODAK EKTACHEM DTE - Pipette verwendet, eine mechanische Doppelspitzenpipette, mit der gleichzeitig sowohl 10 μl Probenflüssigkeit als auch

10 µl Elektrolyt-Referenzlösung aus dem KODAK EKTACHEM-Doppelprobengefäß angesaugt werden können. Dieses Gefäß ist in eine speziell dafür vorgesehene Halterung am Modul eingesetzt und sollte wegen Verdunstungsgefahr der Flüssigkeiten nicht länger als fünf Minuten offen stehen. Sobald mit der in die Betropfungsstation eingeführten Pipette das Analysenplättchen mit den Flüssigkeiten beschickt wird, springt eine auf 3 Minuten gestellte Schaltuhr an. Ist dies geschehen, bewegt sich das Elektrometer über das Plättchen, und es wird an Ort und Stelle 3 Minuten lang bei 25 Grad Celsius inkubiert. Während dieser Zeit blinkt ein rotes Licht am Modul; erst nach dessen Erlöschen kann das nächste potentiometrische Plättchen eingeschoben werden. Die beiden Flüssigkeiten breiten sich rasch aus und wandern in die entsprechenden Meßkompartimente. Man erhält zwei Halbzellen, zwischen denen sich bereits 20 Sekunden nach Probenaufgabe über die Papierbrücke eine Flüssigkeitsverbindung ausbildet. Das Elektrometer besitzt zwei Kontaktpunkte, der eine dringt in die Kontaktfläche der mit der Referenzflüssigkeit beschickten, der andere in die Kontaktfläche der mit der Probe beschickten Plättchenhälfte ein. (Abb. 4)
Nach Ablauf der dreiminütigen Inkubationszeit ertönt ein Signalton und das Elektrometer mißt die Potentialdifferenz zwischen den beiden ionenselektiven Elektroden im Plättchen. Diese Potentialdifferenz ist proportional der Differenz in der Ionenkonzentration zwischen der Referenz- und der Probenflüssigkeit. Anhand dieses Wertes, der an

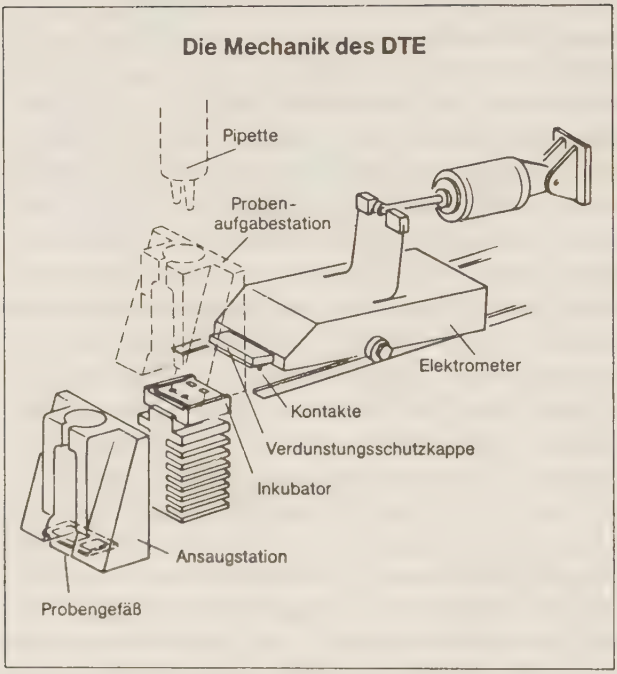


Abb.4 Die Mechanik des DTE-Moduls
(aus Ronchetti et al., 1984)

das EKTACHEM DT60 Analysengerät übermittelt wird, in Kombination mit den Kalibrationsparametern, errechnet der Mikrocomputer die Elektrolytkonzentration, die dann über den Thermodrucker ausgedruckt wird. Das Analysenplättchen bleibt in der Station, bis es vom nachfolgenden in den Plättchenbehälter auf der linken Seite des Moduls geschoben wird[54].

2.1.3. DTSC - MODUL

Enzymaktivitäten werden im DTSC-Modul analysiert. Nachdem ein Analysenplättchen in der vorgeschriebenen Weise in die Ladestation gelegt wurde, wird es automatisch zum Strichcodeleser im Modul transportiert, wo seine Identifikation erfolgt (Testart und Generationsnummer). Handelt es sich um einen gültigen Test, erscheint der Testname auf dem Anzeigefeld des Analyzers, und alle folgenden Schritte werden im Modul automatisch durchgeführt. Anderenfalls wird das Plättchen zur Ladestation zurückgeschickt, wo es manuell entfernt oder erneut eingegeben werden kann. Mit dem Aufleuchten einer grünen Anzeigelampe am DTSC-Modul, sowie einem akustischen Signal wird angezeigt, daß die Betropfung des Plättchens vorgenommen werden kann. Diese erfolgt - wie schon bei den anderen kolorimetrischen Tests im Analyzer - mittels der batteriebetriebenen KODAK EKTACHEM DT-Pipette und wird automatisch von einem optischen Tropfendetektor überwacht. Anschließend wird das mit 10 µl Probenflüssigkeit betropfte Plättchen zur Vorwärmstation und von dort zum Inkubator transportiert.

Hier inkubiert es bei etwa 37 Grad Celsius für eine durch den Test festgelegte Zeitspanne. Ist die Inkubation abgeschlossen, erfolgt der Weitertransport des Plättchens in die Meßstation, ein Vorgang, der nur kurzfristig unterbrochen wird, um dem System die Möglichkeit zu geben, eine Weiß-, eine Schwarz- und eine Spannungs-Referenzwertmessung vorzunehmen, die für eine spätere Verwendung im Analyzer gespeichert werden[54].

In der Reflektometer-Meßstation führt ein Photometer mit gepulster Xenon-Blitzlampe im Wellenlängebereich von UV bis IR innerhalb von 5 Minuten je nach Testart mehrere Messungen durch[55]. Das Licht, das von dem Analysenplättchen reflektiert wird, passiert dabei ein Interferenzfilter entsprechender Wellenlänge und fällt auf eine Silizium-Fotozelle, deren elektrische Signale dann in einen A/D-Wandler eingespeist werden. Die so entstehenden Daten werden an den DT60 Analyzer gesendet, dessen Mikrocomputer Reflexions-, Referenzwertmessungen und Kalibrierungsparameter dazu verwendet, die Konzentration der Probe zu ermitteln.
Sind die Messungen an dem Plättchen abgeschlossen, wird es automatisch zum Plättchenbehälter transportiert und dort abgelegt. Nun kann das nächste Testplättchen, dessen automatischer Transport in die Betropfungsstation bereits bis zu zwei Minuten vor Beendigung des laufenden Testes beginnen kann, beschickt werden[54].

2.2. Das Analysenplättchen

Wie bereits erwähnt, ist die Grundlage des KODAK EKTACHEM-Analysensystems die Mehrschichtentechnologie. Die entscheidenden Impulse zu ihrer Entwicklung lieferte die große Erfahrung in der Herstellung von Filmen, besonders von Filmen für Sofortbildkameras. Dies zeigt sich sowohl in der Technik des lagenweisen Aufbringens mehrerer hauchdünner Schichten übereinander, die die unterschiedlichsten Chemikalien enthalten können und in denen chemische Reaktionen in relativ kurzer Zeit vollständig ablaufen müssen, als auch in der Verwendung von Pigmenten, Farbstoffen, Klebstoffen, Beizen und anderen Materialien, die in der Fotoindustrie eine Rolle spielen[35]. So ähnelt ein EKTACHEM-Analysenplättchen auch weit mehr einem Farbfilm als einem der herkömmlichen Teststreifen.
Wenngleich es für jede Testart ein spezifisches Analysenplättchen gibt, ist doch der grundsätzliche Aufbau aller dieser Trockenreagenzträger gleich, einmal abgesehen von den mit ionenselektiven Elektroden arbeitenden Elektrolytplättchen. Auf einen transparenten Träger aus Polyester (Polyäthylenterephthalat) sind, je nach Testart, eine oder mehrere reagenzienhaltige Schichten aufgebracht, in denen nahezu alle chemischen und physikalischen Reaktionen ablaufen. Diese Reaktionszone überzieht eine weiße, poröse Verteiler-

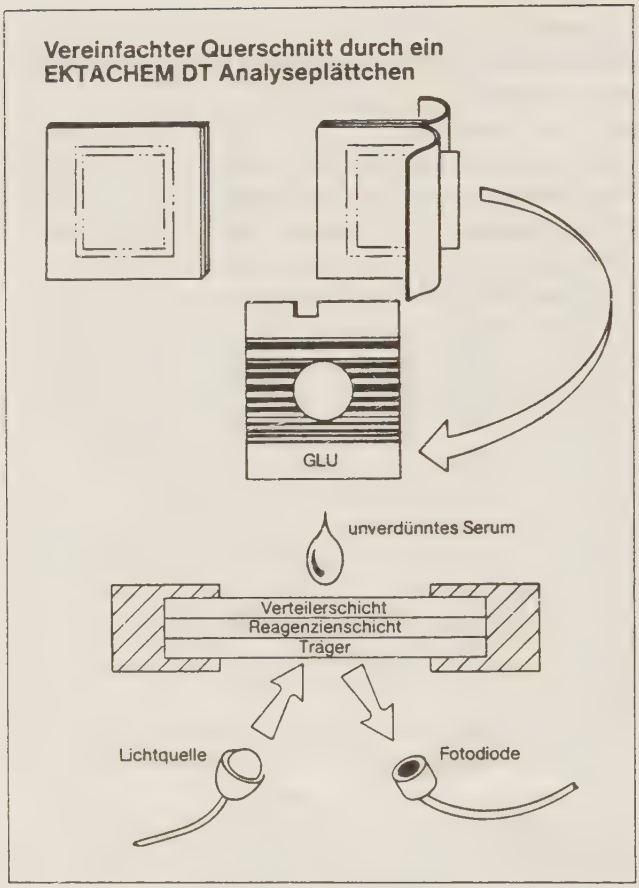


Abb.5 Schematische Darstellung eines EKTACHEM DT Analysenplättchens (aus Ronchetti et al., 1984)

schicht, die u.U. auch an dem Reaktionsgeschehen beteiligte Reagenzien enthalten kann. Auf sie wird die Probenflüssigkeit aufgetropft[16].

Dieser mehrschichtige Film ist in einen rechteckigen Plastikrahmen eingelegt, der auf beiden Seiten eine runde Öffnung von ca 1 cm Durchmesser freiläßt zur Probenaufgabe (oben) bzw. für die reflexionsphotometrische Messung (unten). Die Oberseite des Rahmens trägt eine Aufschrift, die die jeweilige Testart angibt, und einen Strichcode zur Identifizierung durch den Mikrocomputer des Analysengeräts. Das gesamte Plättchen besitzt etwa die Größe einer Briefmarke. Es ist zum einmaligen Gebrauch bestimmt und wird immer einzeln, luft- und lichtundurchlässig verpackt.
Die schematische Darstellung eines EKTACHEM-Analysenplättchens zeigt Abbildung 5.
Wird die vorgeschriebene Lagertemperatur von 8 Grad C und tiefer - bzw. von -18 Grad C bei CK- und AMYL-Plättchen - eingehalten, sind die trockenchemischen Reagenzträger mindestens 12 Monate lang haltbar (aufgedrucktes Verfalldatum). Vor Gebrauch sind sie auf Zimmertemperatur vorzuwärmen. Nicht ausgepackte Plättchen können ohne Wirksamkeitsverlust wieder gekühlt oder tiefgefroren werden.

2.2.1. Verteilerschicht

Die Verteilerschicht besteht aus einem isotropen Polymer, das als Emulsion aufgegeben wird und

über den Unterschichten hoch porös trocknet. Ihre Dicke variiert zwischen 100 und 300 µm, abhängig von der Testart, mit einer durchschnittlichen Porengröße von ca 1,5 µm, und sie besitzt ein Leervolumen von 60 bis 90 %[15].

Die Verteilerschicht hat vielfältige Aufgaben zu erfüllen. Nach der Auftropfung von 10 µl Probenflüssigkeit verteilt sich diese - bedingt durch die Kapillarwirkung des porösen Materials - rasch und gleichmäßig, hauptsächlich in lateraler Richtung, bis sämtliche Hohlräume ausgefüllt sind. Von den gelatinehaltigen Unterschichten wird sie vorübergehend noch ausgeschlossen. Liefe ausschließlich dieser Prozeß ab, wäre das Probenvolumen ohne Bedeutung sowohl für die Flüssigkeitsmenge und damit die Analytenkonzentration pro Flächeneinheit, als auch für die daraus resultierende Reflexionsdichtemessung. Jedoch beginnt bereits während des Verteilungsvorganges, der normalerweise 5-10 Sekunden dauert, das Matrixpolymer der angrenzenden Reagenzienschicht etwas zu quellen und damit Flüssigkeit aus der Verteilerschicht abzuziehen. Trotzdem führt diese minimale Zeitdifferenz zwischen lateraler Verteilung und einsetzender Drainage zu einer gewissen Unempfindlichkeit des Systems gegenüber Schwankungen des Probenvolumens. Untersuchungen haben gezeigt, daß eine 10 %ige Änderung des Tropfenvolumens lediglich eine 1 %ige Reflexionsdichteänderung bewirkt[16].

Die Verteilerschicht hat aber neben ihrer Verteilungs- auch eine Filterfunktion zu erfüllen. In ihrer Porenstruktur fängt sie nicht nur Zellen, Kristalle und andere kleine Partikel ab, sondern sie hält auch große Moleküle, wie Proteine, zurück. Was also diese Schicht verläßt, ist ein proteinfreies Filtrat[75].
Die Verteilerschicht kann aus verschiedenen Materialien aufgebaut sein wie mikrokristalliner Cellulose oder polymeren Plastikkügelchen, meist besteht sie jedoch aus Celluloseacetat, in das Pigmente wie Titandioxid oder Bariumsulfat eingelagert sind. Diese weißen Pigmente dienen einem doppelten Zweck. Einmal sollen sie Verfärbungen oder Trübungen in der Patientenprobe von der Indikatorzone der Reagenzienschicht abschirmen, da deren reflexionsphotometrische Messung bekanntlich von der Plättchenunterseite her erfolgt[16]. Dies bewirkt, daß das Filmsystem im allgemeinen wenig empfindlich ist gegenüber Störungen, die durch hämolytische, lipämische oder ikterische Proben hervorgerufen werden können[58]. Zum anderen dienen sie als diffuser Reflexionshintergrund, da sie auftreffendes Licht reflektieren[16].
Schließlich kann die Verteilerschicht auch noch Komponenten enthalten, die direkt am Reaktionsgeschehen beteiligt sind oder die eine gewisse Vorselektion bewirken[75].

2.2.2. Reagenzienschicht

Alle Substanzen mit niedrigem Molekulargewicht, die die oberste Schicht passiert haben, diffundieren in die Reagenzienschicht und setzen dort die Reaktionsfolge in Gang. Eingebettet sind die Reagenzien in eine Matrix bestehend aus hydrophilen Polymeren wie Gelatine und Agarose, die auf ein Mehrfaches ihres Trockenvolumens aufquillt, sobald sie mit Wasser in Kontakt kommt. Aufgabe dieser Schicht ist es, den Analyten in einem oder in mehreren Reaktionsschritten in eine quantifizierbare Form zu überführen[75]. Meist handelt es sich bei dem letzten Schritt um eine Farbreaktion, wobei entweder die Bildungsgeschwindigkeit des Farbstoffes (kinetische Messung) oder die nach einer festgesetzten Zeit entstandene Farbstoffmenge (Endpunktmessung) ein Maß für die Aktivität bzw. Konzentration des gesuchten Parameters darstellt.

Durch die Mehrschichtenfilmtechnik ist es möglich, eine Reihe chemischer und physikalischer Reaktionen in einem Analysenplättchen hintereinanderzuschalten. Eine Vielzahl verschiedener Mechanismen findet Verwendung: verschiedene Filtrationsformen von der Grobfiltration bis zur selektiven Mikrofiltration und Dialyse; selektive Absorption, z.B. durch Ionenaustausch, um den Analyten von störenden Substanzen zu trennen; Verankerung von Reaktanten und Katalysatoren in den verschiedenen Schichten und kinetische Optimierung, wobei Reaktionsfolge und zeitlicher Ablauf kontrolliert werden, um nur einige zu nennen[75].

III. E I G E N E U N T E R S U C H U N G E N

1. MATERIAL UND METHODEN

1.1. M a t e r i a l

1.1.1. Proben

Als Probenmaterial wurde hämolysefreies Serum verwendet. Die Blutproben wurden den Kleintieren aus der Vena cephalica antebrachii, den Pferden aus der Vena jugularis entnommen und zur Serumgewinnung nach mindestens 2o-minütiger Koagulationszeit 1o Minuten lang bei 3ooo U/min. zentrifugiert.

Sowohl für die mit dem KODAK EKTACHEM DT6o Analyzer als auch für die mittels der Referenzmethoden ausgeführten Bestimmungen wurde ein und dieselbe Serumprobe des jeweiligen Tieres verwendet. Während die Referenzbestimmungen immer am Tage der Probennahme durchgeführt wurden, erfolgten die Messungen mit dem EKTACHEM DT6o-Gerät entweder ebenfalls noch am gleichen Tage, oder aber die Seren wurden innerhalb von 24 Stunden tiefgefroren, über einen Zeitraum von max. drei Tagen bei -20 Grad Célsius aufbewahrt und erst unmittelbar vor Gebrauch wieder aufgetaut.

1.1.2. Tiere

Hunde, Katzen und Pferde, die an der I. Medizinischen Tierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München zur Untersuchung vorgestellt wurden, lieferten die benötigten Seren. Dabei handelte es sich sowohl um klinisch gesunde Tiere (Impfung, Vorsorgeuntersuchung etc.) als auch um solche, die die verschiedensten Krankheitssymptome zeigten und deswegen entweder ambulant behandelt oder stationär aufgenommen wurden.

Die Patienten wurden hauptsächlich nach dem Gesichtspunkt ausgewählt, neben den sogenannten "normalen" Blutwerten zu jedem Parameter auch eine gewisse Anzahl pathologisch veränderter Werte zu erhalten, um so jeweils möglichst den gesamten Meßbereich des Testgerätes abdecken zu können.

Insgesamt belief sich die Zahl der untersuchten Serumproben auf 557, davon stammten 224 von Hunden, 194 von Katzen und 139 von Pferden.

Folgende Parameter wurden bestimmt:

bei Hund und Katze:
ALT, CK, AP, Gesamtbilirubin, Glucose, Harnstoff, α-Amylase, Gesamteiweiß, Kreatinin, Natrium und Kalium.

beim Pferd:
AST, CK, AP, LDH, GGT, Gesamtbilirubin, Harnstoff, Gesamteiweiß, Kreatinin, Natrium und Kalium.

Nicht immer konnten aus jeder Blutprobe alle Werte bestimmt werden, da es - besonders bei Katzen - manchmal unmöglich war, eine ausreichende Serummenge zu gewinnen.

1.1.3. Geräte

Die nachstehenden Laborgeräte und -materialien fanden Verwendung:

a) Das zu testende KODAK EKTACHEM DT60 Analysengerät, bestehend aus dem DT60 Analyzer, dem DTE- und dem DTSC-Modul, sowie die dazugehörigen EKTACHEM Analysenplättchen, Spezialpipetten, Pipettenspitzen, Doppelprobengefäße, Kalibratoren, Referenz- und Kontrollflüssigkeiten.

b) Der HITACHI 705 Autoanalyzer der Firma Hitachi und die dazugehörigen Systempackungen der Firma Boehringer Mannheim (Boehringer Mannheim Automated Analysis for Hitachi 705).

c) Das Flammenphotometer FCM 6341 (Flammenphotometer, computergesteuert, Mehrkanal) der Firma Eppendorf.

Tab. 1 Referenzbereiche der bei Hund, Katze und Pferd untersuchten Blutparameter

	Hund	Katze	Pferd	Einheit
AST	-	-	bis 240	U/l
ALT	bis 50	bis 50	-	U/l
CK	bis 50	bis 50	bis 55	U/l
AP	bis 130	bis 70	bis 350	U/l
LDH	-	-	bis 400	U/l
GGT	-	-	bis 20	U/l
α-Amylase	1600±370	1380±410	-	U/l
Gesamtbilirubin	bis 0,2(0,4)	bis 0,2	0,5-2,8	mg/dl
Glucose	60-90	55-130	-	mg/dl
Harnstoff	20-50	20-65	20-40	mg/dl
Gesamteiweiß	5,5-7,5	5,5-7,8	5,5-7,5	g/dl
Creatinin	bis 1,6	bis 1,6	bis 2,0	mg/dl
Natrium	140-155	145-158	125-150	mmol/l
Kalium	3,5-5,1	3,0-4,8	2,8-4,5	mmol/l

(nach Kraft und Dürr, 1981)

1.2. Methoden

1.2.1. Qualitätskontrolle

"Zuverlässigkeit" steht im Rahmen der Qualitätskontrolle als Oberbegriff besonders für Präzision und Richtigkeit [2], daneben umfaßt sie aber auch noch die Begriffe Spezifität, Empfindlichkeit und praktische Bewährung über eine längere Zeitdauer [72].

Die Präzision beschreibt dabei die Lage einzelner Meßergebnisse von Vielfachbestimmungen eines Untersuchungsgutes zueinander [85]. Sie ist Kenngröße des zufälligen Fehlers und gilt als wichtigstes Kriterium für die Zuverlässigkeit einer Methode im klinisch-chemischen Labor [72].

In der vorliegenden Arbeit wurde sie bestimmt als Präzision in der Serie durch wiederholte Messung je einer Serumprobe von Hund, Katze und Pferd am selben Tag und als Präzision von Tag zu Tag, wobei jeweils dieselbe Probe eines Serumpools pro Tierart an verschiedenen Tagen einmal gemessen wurde.

In der Regel ist die Präzision in der Serie besser [72]. Als Maß für die Präzision gilt der Variationskoeffizient (VK). Er gibt an, wieviel Prozent des Mittelwertes ($\bar{x}$) der Mehrfachbestimmungen deren Standardabweichung (s) beträgt ($VK\% = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$).

Entsprechend bestehender Richtlinien (z.B. der Bundesärztekammer von 1971) soll abhängig vom Blutbestandteil ein VK von unter 5% bei Substraten

und Elektrolyten oder von unter 10% bei Enzymen erreicht werden[85].

Die Richtigkeit einer Methode gibt an, um wieviel Prozent ein einzelner Meßwert (Istwert) von der tatsächlich im Untersuchungsmaterial vorliegenden Menge (Sollwert) abweicht.

$$\left(\text{Richtigkeitsmaß} = \frac{\text{Sollwert-Istwert}}{\text{Sollwert}} \cdot 100 \right)$$

Sie ist Kenngröße für den systematischen Fehler und für ihre Beurteilung stehen verschiedene Methoden zur Verfügung[72].

Hier wurde die Richtigkeit der Bestimmungen durch Methodenvergleich ermittelt, wobei mindestens 100 Seren pro Parameter und Tierart analysiert wurden. Als Vergleich dienten Referenzwerte, die anhand der jeweils gleichen Serumproben mit möglichst zuverlässigen Methoden (zumeist anerkannten Standardmethoden) ermittelt wurden.

Die Übereinstimmung wird als ausreichend angesehen, wenn die prozentuale Abweichung vom Sollwert kleiner ist als der 3fache Variationskoeffizient der Präzisionskontrolle von Tag zu Tag, jedoch darf sie keinesfalls größer als 10% bei Substrat- bzw. Elektrolytbestimmungen sein; bei Enzymaktivitätsbestimmungen sind maximal 20% zulässig[2].

Die statistische Qualitätskontrolle erfaßt also nach Ausführung der Präzisions- und Richtigkeitskontrollen sowohl die zufälligen, unvermeidbaren als auch die systematischen, vermeidbaren Fehler, die bei der Durchführung von Analysen auftreten können[2].

Zur Überprüfung der Eichung des EKTACHEM-Testgerätes, das laut Hersteller nur alle drei Monate kalibriert werden muß, wurden zu Beginn eines jeden Arbeitstages sämtliche Parameter aus dem KODAK EKTACHEM DT Kontrollserum mit bekannter Analytenkonzentration bestimmt. Lag einer der gefundenen Meßwerte nicht innerhalb des engen Vertrauensbereiches um den jeweiligen Sollwert des Kontrollserums, so wurde der betreffende Parameter neu kalibriert und nochmals mit Kontrollserum überprüft, bevor neue Messungen an Patientenseren erfolgten.

1.2.2. Enzym- und Substratbestimmungen

Zur Erstellung der Vergleichswerte wurden alle Enzyme und Substrate der untersuchten Serumproben auf dem HITACHI 705 Autoanalyzer bestimmt[3].

Aspartat - Aminotransferase
(AST; EC 2.6.1.1.) bzw.
Glutamat - Oxalacetat - Transaminase (GOT)

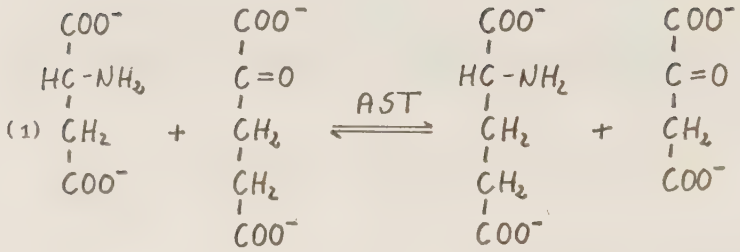
Das Enzym AST katalysiert die Gleichgewichtsreaktion:

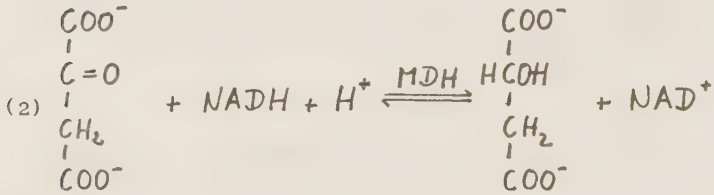
$$\text{L-Aspartat} + \alpha\text{-Ketoglutarat} \overset{\text{AST}}{\rightleftharpoons} \text{Oxalacetat} + \text{L-Glutamat}$$

a) Referenzmethode
Kinetischer UV-Test
Optimierte Standardmethode (GOT opt.) nach den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie.

Prinzip:
Die AST katalysiert die Übertragung der 2-Amino-Gruppe von Aspartat auf α-Ketoglutarat (2-Oxoglutarat) unter Bildung von Glutamat und Oxalacetat(1). Letzteres wird im optischen Test in der gekoppelten, durch Malat-Dehydrogenase(MDH) katalysierten Indikatorreaktion(2) bestimmt, wobei die Geschwindigkeit der Oxalacetat-Zunahme derjenigen der $NADH_2$-Abnahme proportional ist.
Meßgröße ist $NADH_2$, dessen Extinktionsabfall sich wiederum direkt proportional zur AST-Aktivität verhält. Die photometrische Messung erfolgt bei 340 nm[85,10].

Reaktionsgleichungen:





Meßbedingungen:

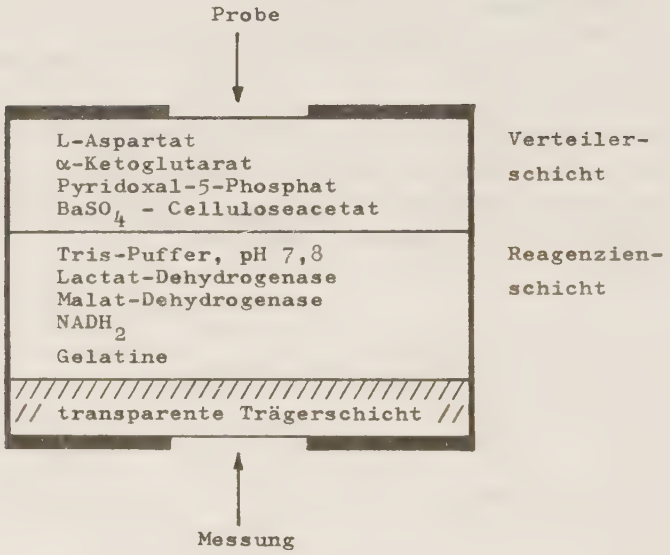
Chem.Funktion	Substanz	Endkonzentrationen im Test
Puffer	Phosphat-Puffer,pH 7,4	80 mmol/l
Substrat	L-Aspartat	200 mmol/l
Coenzyme	$NADH_2$	0,18 mmol/l
	α-Ketoglutarat	12 mmol/l
Enzyme	Malat-Dehydrogenase	0,6 U/ml
	Lactat-Dehydrogenase	1,2 U/ml

Meßtemperatur	25 Grad C
Wellenlänge	340 nm
Probenmaterial	Serum
Probenvolumen	20 µl
Verdünnungsgrenze	400 U/l
Verdünnung mit physiol.Kochsalzlösung 1:3	

Anmerkung:
Die Zugabe von LDH zur Testlösung erfolgt, einmal um im Serum befindliches Pyruvat während der Vorinkubation abzubauen und zum anderen um auch höhere AST-Aktivitäten zu erfassen[40].

b) EKTACHEM-Methode

Querschnitt durch das AST-Plättchen:



Prinzip:
Die verwendete Testmethode wird von der International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) empfohlen. Das Testprinzip ist nahezu das gleiche wie bei der Referenzmethode, jedoch fordert die IFCC eine Präinkubation mit Pyridoxal-5-Phosphat (P-5-P), um die AST schnell und vollständig während der lag-Phase - also in der Zeitspanne nach dem Start einer gekoppelten Reaktion, in der die Extinktionszunahme noch nicht linear verläuft - zu reaktivieren[23].

Deshalb enthält das AST-Plättchen in der Verteilerschicht - einer porösen Matrix bestehend aus Celluloseacetat und reflektierenden Bariumsulfatteilchen - neben Aspartat und α-Ketoglutarat auch eine hohe Konzentration an Pyridoxal-5-Phosphat (ca das 30fache der IFCC-Empfehlung)[69]. Hier läuft dann die durch AST katalysierte Transaminierung ab, die die Umwandlung von L-Aspartat zu Oxalacetat zur Folge hat (1). Die übrigen Komponenten, eingebettet in eine Gelatinematrix, bilden die Reagenzienschicht, in der nun das gebildete Oxalacetat in Gegenwart von $NADH_2$ durch Malat-Dehydrogenase(MDH) in Malat umgewandelt wird (2). Die Oxidationsrate des $NADH_2$ zu NAD^+ wird reflexionsphotometrisch bei 340 nm gemessen. Aus der Änderung der Reflexionsdichte wird dann die AST-Aktivität errechnet[27].

Reaktionsgleichungen:

(1) L-Aspartat + α-Ketoglutarat $\xrightarrow[\text{P-5-P}]{\text{AST}}$ Oxalacetat + L-Glutamat

(2) Oxalacetat + NADH + H^+ $\xrightarrow{\text{MDH}}$ Malat + NAD^+

Meßbedingungen:

Meßtemperatur	37 Grad C
Wellenlänge	340 nm
Versuchszeit	max. 5 Minuten
Meßbereich	4 - 950 U/l
Probenmaterial	Serum, Plasma (10 µl)

Anmerkung:
Die Aminotransferasen (AST,ALT) haben Pyridoxal-5-Phosphat als prosthetische Gruppe gemeinsam. Bei der Transaminierung dient die Aldehydgruppe des Pyridoxalphosphats als Akzeptor für die Aminogruppe der Aminosäure. Die Aminogruppe wird dann von dem so entstandenen Pyridoxaminphosphat auf die Ketosäuren übertragen. Die IFCC hat deshalb empfohlen, AST und ALT mit Pyridoxal-5-phosphat durch Präinkubation zu aktivieren.
Bei Anwendung von Trispuffer ist diese Aktivierung größer als in Phosphatpuffer[74].
Zur Verwendung der Lactat-Dehydrogenase: siehe Referenzmethode.

Alanin - Aminotransferase
(ALT; EC 2.6.1.2.) bzw.
Glutamat - Pyruvat - Transaminase (GPT)

Das Enzym ALT katalysiert die Gleichgewichtsreaktion:

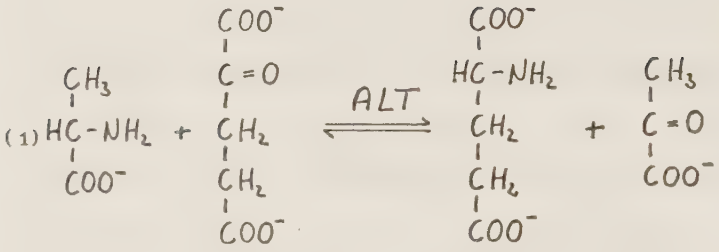
$$\text{L-Alanin} + \alpha\text{-Ketoglutarat} \overset{\text{ALT}}{\rightleftharpoons} \text{Pyruvat} + \text{L-Glutamat}$$

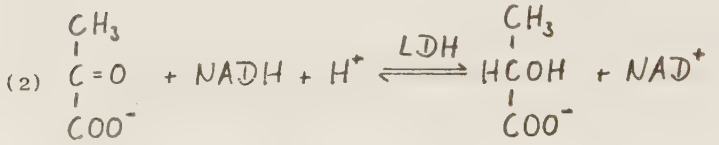
und nimmt eine wichtige Schlüsselstellung in der Gluconeogenese ein[72].

a) Referenzmethode
Kinetischer UV-Test
Optimierte Standardmethode (GPT opt.) nach den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie.

Prinzip:
Die ALT katalysiert via Transaminierung die Umwandlung von Alanin zu Pyruvat (1). Die Aktivität der ALT läßt sich aus der Geschwindigkeit der durch diese Reaktion hervorgerufenen Pyruvat-Zunahme bestimmen. Diese wird im optischen Test mit der durch Lactat-Dehydrogenase(LDH) katalysierten Indikatorreaktion (2) bestimmt. Meßgröße ist - wie bei der AST-Bestimmung - $NADH_2$. Die Geschwindigkeit der $NADH_2$-Abnahme verhält sich proportional zur ALT-Aktivität. Die Messung der Extinktion erfolgt bei 340 nm[85,11].

Reaktionsgleichungen:





Meßbedingungen:

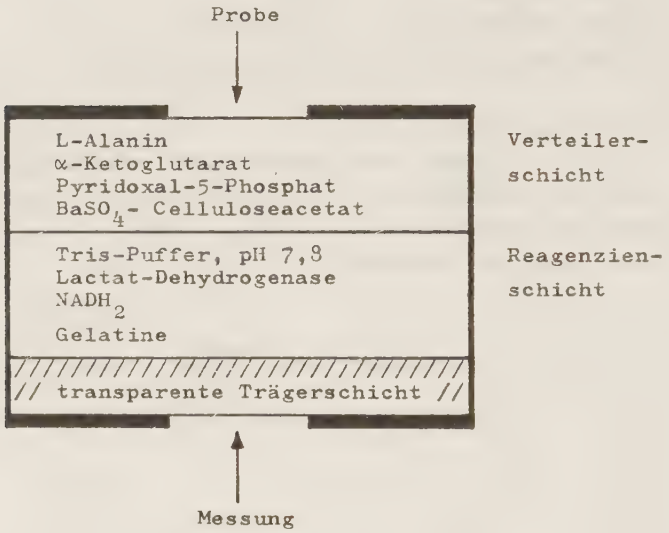
Chem.Funktion	Substanz	Endkonzentrationen im Test
Puffer	Phosphat-Puffer, pH 7,4	80 mmol/l
Substrat	L-Alanin	800 mmol/l
Coenzyme	$NADH_2$	0,18 mmol/l
	α-Ketoglutarat	18 mmol/l
Enzym	Lactat-Dehydrogenase	1,2 U/ml

Meßtemperatur	25 Grad C
Wellenlänge	340 nm
Probenmaterial	Serum
Probenvolumen	20 µl
Verdünnungsgrenze	300 U/l
Verdünnung mit physiol.Kochsalzlösung 1:3	

Anmerkung:
Im Serum befinden sich Pyruvat und LDH. Um dieses Pyruvat während der Vorinkubation abzubauen und zum anderen auch höhere ALT-Aktivitäten zu erfassen, wird LDH zugesetzt[11].

b) EKTACHEM-Methode

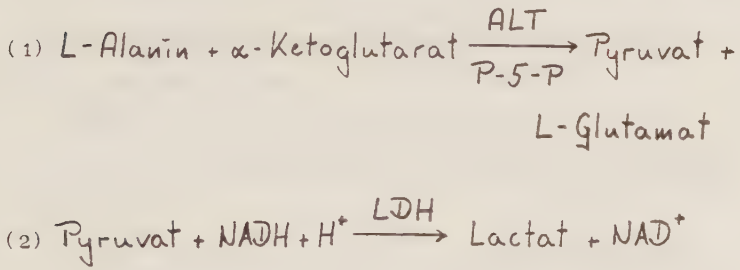
Querschnitt durch das ALT-Plättchen:



Prinzip:
Methode nach den Empfehlungen der International Federation of Clinical Chemistry (IFCC). Analysenplättchenaufbau und Enzymaktivitätsmessung sind analog der AST-Bestimmung. Nach Aktivierung durch Pyridoxal-5-Phosphat (P-5-P) katalysiert die ALT die Transaminierungsreaktion, bei der aus L-Alanin Pyruvat entsteht (1), welches dann in einem zweiten Schritt - unter Einwirkung von Lactat-Dehydrogenase (LDH) - mit $NADH_2$ zu Lactat reagiert (2). Die Oxidationsrate des $NADH_2$ wird

wiederum reflektometrisch bei 340 nm gemessen und dazu verwendet, die ALT-Aktivität zu ermitteln[24].

Reaktionsgleichungen:



Meßbedingungen:

Meßtemperatur	37 Grad C
Wellenlänge	340 nm
Versuchszeit	max. 5 Minuten
Meßbereich	3 - 950 U/l
Probenmaterial	Serum, Plasma (10 µl)

Anmerkung:
siehe AST-Bestimmung.

Creatin - Kinase
(CK; EC 2.7.3.2.)

Die Creatinkinase katalysiert die Synthese und Spaltung des Creatinphosphats:

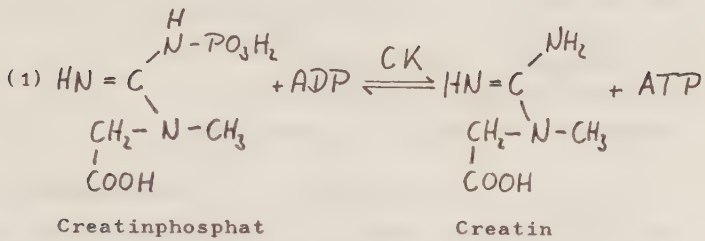
$$\text{Creatin} + \text{ATP} \underset{\text{pH } 6{,}8}{\overset{\text{CK pH } 9{,}0}{\rightleftharpoons}} \text{Creatinphosphat} + \text{ADP}$$

Bei pH 7 liegt das Gleichgewicht auf der linken Seite, für die Phosphorylierung bei pH 9[72].

a) Referenzmethode
Kinetischer UV-Test
Optimierte Standardmethode (CK NAC aktiviert) nach den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie.

Prinzip:
Es handelt sich um einen optischen Test mit Hilfs- und Indikatorreaktion. Die CK katalysiert die Übertragung der Phosphatgruppe von Creatinphosphat auf ADP unter Bildung von ATP (1). Die Messung der Aktivität der CK erfolgt über den Nachweis dieses entstehenden ATPs mit Hilfe der Hexokinase(HK)-Reaktion als Hilfssystem (2) und der Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (G6P-DH) als Indikatorsystem (3).
Meßgröße ist die Extinktionszunahme von $NADPH_2$, die der CK-Aktivität im Probevolumen proportional ist. Die Messung der Extinktion erfolgt bei 340 nm[72,6]. Durch Zusatz des Aktivators N-Acetylcystein (NAC) wird inaktive CK reaktiviert (NAC-Methode)[85].

Reaktionsgleichungen:



(2) ATP + Glucose $\overset{HK}{\rightleftharpoons}$ Glucose-6-Phosphat + ADP

(3) Glucose-6-Phosphat + $NADP^+$ $\overset{G6P\text{-}DH}{\rightleftharpoons}$ Gluconat-6-Phosphat + NADPH + H^+

Meßbedingungen:

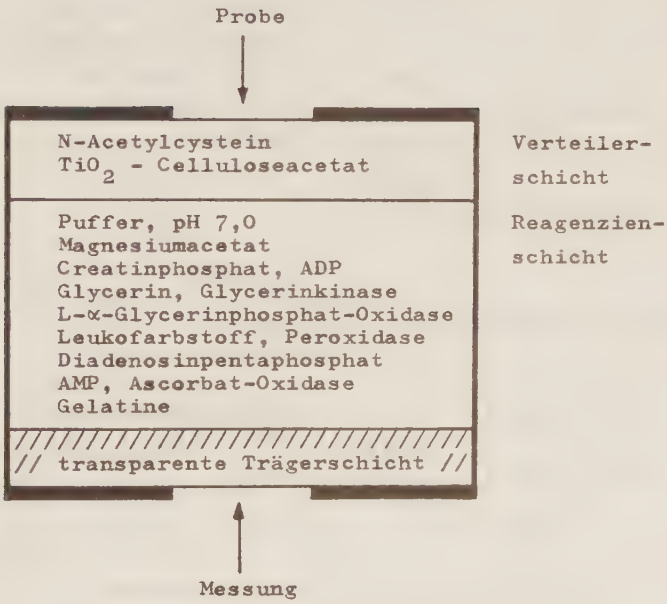
Chem. Funktion	Substanz	Endkonzentrationen im Test
Puffer	Imidazol-Acetat, pH 6,7	100 mmol/l
	Mg-Acetat	10 mmol/l
Substrate	Creatinphosphat	30 mmol/l
	Glucose	20 mmol/l
Coenzym	$NADP^+$	2 mmol/l
Enzyme	Hexokinase	≥2500 U/l
	G-6P-DH	≥1500 U/l
Reaktivator	N-Acetylcystein	20 mmol/l
Inhibitoren	AMP	5 mmol/l
	ADP	2 mmol/l
	Diadenosinpentaphosphat	0,01 mmol/l
	EDTA	2 mmol/l

Meßtemperatur	25 Grad C
Wellenlänge	340 nm
Probenmaterial	Serum
Probenvolumen	10 µl
Verdünnungsgrenze	1500 U/l
Verdünnung mit physiol.Kochsalzlösung	1:11

Anmerkung:
Das Enzym CK wird durch Oxidation von essentiellen SH-Gruppen im aktiven Zentrum relativ rasch inaktiviert. Vor Beginn der Messung muß diese Oxidation durch den zugesetzten Reaktivator (N-Acetylcystein) rückgängig gemacht werden.
Die besonders in hämolytischen Seren enthaltene Adenylat-Kinase aus den Erythrozyten, die das Ergebnis verfälscht (zu hohe Werte), wird durch das Inhibitorgemisch aus AMP (ADP) und Diadenosinpentaphosphat weitgehend gehemmt.
Der EDTA-Zusatz soll Störungen des Tests durch Erdalkali- oder Schwermetallionen ausschließen[6].
Ferner benötigt die Creatinkinase zur Reaktion Mg^{++}, das mit ATP einen Komplex bildet[72].

b) EKTACHEM-Methode

Querschnitt durch das CK-Plättchen:



Prinzip:
Wie bei der Referenzmethode wird auch hier die Creatinkinase (CK) zunächst durch das in der Verteilerschicht befindliche N-Acetylcystein (NAC) noch während der lag-Phase aktiviert, bevor das Enzym dann die Umwandlung von Creatinphosphat und ADP in Creatin und ATP katalysiert (1). Der weitere Reaktionsablauf ist jedoch anders. Katalysiert durch Glycerinkinase (GK) phosphoryliert das gebil-

dete ATP Glycerin zu L-α-Glycerinphosphat (2). Letzteres wird durch molekularen Sauerstoff in Gegenwart von L-α-Glycerinphosphat-oxidase (α-GPO) zu Dihydroxyacetonphosphat und Wasserstoffperoxid oxidiert (3). Schließlich entsteht in der Peroxidase(POD)-Reaktion ein Farbstoff, dessen Bildungsgeschwindigkeit der CK-Aktivität proportional ist und als Änderung der Reflexionsdichte bei 680 nm gemessen wird[28].

Reaktionsgleichungen:

(1) Creatinphosphat + ADP $\xrightarrow[\text{NAC, } Mg^{2+}]{CK}$ Creatin + ATP

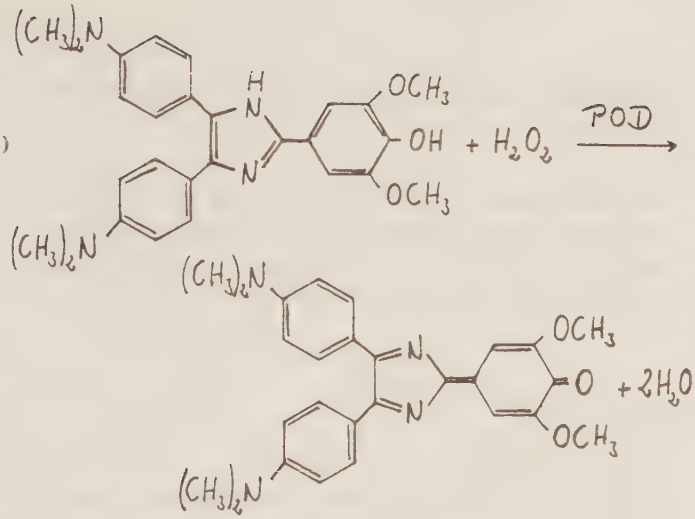
(2) ATP + $\begin{array}{l} CH_2OH \\ | \\ CHOH \\ | \\ CH_2OH \end{array}$ $\xrightarrow{GK}$ $\begin{array}{l} CH_2OPO_3H_2 \\ | \\ CHOH \\ | \\ CH_2OH \end{array}$ + ADP

Glycerin α-Glycerinphosphat

(3) $\begin{array}{l} CH_2OPO_3H_2 \\ | \\ CHOH \\ | \\ CH_2OH \end{array}$ + O_2 $\xrightarrow{\alpha\text{-}GPO}$ $\begin{array}{l} CH_2OPO_3H_2 \\ | \\ C=O \\ | \\ CH_2OH \end{array}$ + H_2O_2

α-Glycerin-phosphat Dihydroxyaceton-phosphat

(4)



Triarylimidazol-Farbstoff

Meßbedingungen:

Meßtemperatur	37 Grad C
Wellenlänge	680 nm
Versuchszeit	max. 5 Minuten
Meßbereich	20 - 1800 U/l
Probenmaterial	Serum, Plasma (10 µl)

Anmerkung:
Zur Verwendung des Inhibitorgemisches aus AMP und Diadenosinpentaphosphat, sowie des Magnesiumacetats: siehe Referenzmethode.
Da CK im Serum instabil ist, muß dieses rasch von den zellulären Bestandteilen abgetrennt und sofort analysiert oder gekühlt werden.
Stark hämolytische Proben sollten nicht verwendet werden[28].

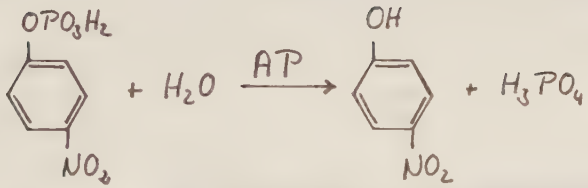
Alkalische Phosphatase
(AP; EC 3.1.3.1.)

Die Gesamtaktivität der alkalischen Phosphatase im Serum umfaßt verschiedene Isoenzyme geringer Substratspezifität, die bei alkalischem pH verschiedene Phosphatester hydrolysieren[72].

a) Referenzmethode
Kinetischer Test
Optimierte Standardmethode (ALP opt.) nach den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie.

Prinzip:
Die AP katalysiert in einem ersten Schritt die Übertragung der Phosphatgruppe vom Substrat p-Nitrophenylphosphat auf Diäthanolaminpuffer unter Bildung von Diäthanolaminphosphat und p-Nitrophenol. Im zweiten Schritt wird Diäthanolaminphosphat durch die Enzymeinwirkung zu Diäthanolamin und anorganischem Phosphat hydrolysiert[85].
Meßgröße ist das p-Nitrophenolat-Anion, das im alkalischen Bereich eine intensive Gelbfärbung besitzt und dessen Bildungsgeschwindigkeit proportional der Phosphatase-Aktivität ist. Die kinetische Messung erfolgt bei 415 nm[4].

Reaktionsgleichung:



p-Nitrophenyl-phosphat p-Nitrophenol

Meßbedingungen:

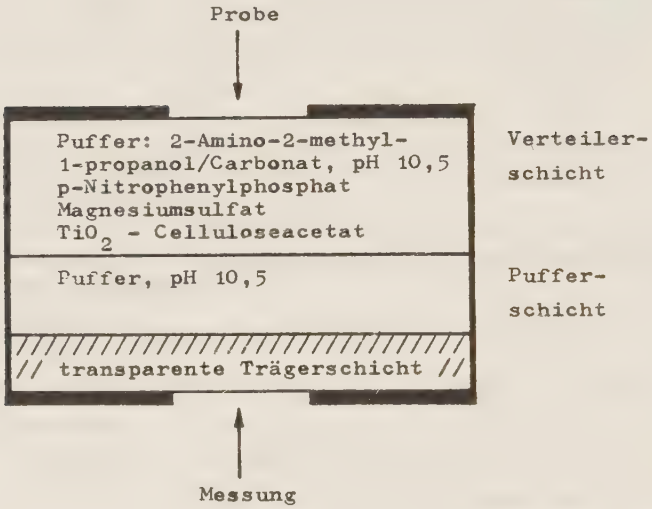
Chem. Funktion	Substanz	Endkonzentrationen im Test
Puffer	Diäthanolamin-Puffer, pH 9,8	1000 mmol/l
	$MgCl_2$	0,5 mmol/l
Substrat	p-Nitrophenylphosphat	10 mmol/l

Meßtemperatur	25 Grad C
Wellenlänge	415 nm
Probenmaterial	Serum
Probenvolumen	5 µl
Verdünnungsgrenze	2000 U/l

Verdünnung mit physiol. Kochsalzlösung 1:5

b) EKTACHEM-Methode

Querschnitt durch das ALKP-Plättchen:



Prinzip:

Das Testprinzip ist das gleiche wie bei der Referenzmethode, beruht also auf der durch alkalische Phosphatase (AP) katalysierten Hydrolyse von p-Nitrophenylphosphat zu gelbgefärbtem p-Nitrophenol. Der alkalische pH von 10,5 wird durch ein Puffersystem, bestehend aus einem Carbonat und 2-Amino-2-methyl-1-propanol, gewährleistet, wobei letzteres als Akzeptor des Phosphatrestes bei der Transphosphorylierung dient[62] Das bereits in der Verteilerschicht - die alle Reaktionskom-

ponenten enthält - gebildete p-Nitrophenol diffundiert in die darunterliegende Schicht und wird dort mittels Reflexion bei 400 nm gemessen. Die Bildungsrate des p-Nitrophenols ist der Enzymaktivität proportional[25].

Reaktionsgleichung:

$$\text{p-Nitrophenylphosphat} + H_2O \xrightarrow[Mg^{2+}]{AP} \text{p-Nitrophenol} + H_3PO_4$$

Meßbedingungen:

Meßtemperatur	37 Grad C
Wellenlänge	400 nm
Versuchszeit	max. 5 Minuten
Meßbereich	20 - 1500 U/l
Probenmaterial	Serum, Plasma (10 µl)

Anmerkung:
Da sich die AP-Werte durch längeres Stehen der Proben bei Zimmertemperatur erhöhen können, sollten diese gekühlt oder eingefroren werden, falls die Analyse nicht sofort durchgeführt werden kann. Hämolyse stört den Test[25].

Lactat - Dehydrogenase
(LDH; EC 1.1.1.27.)

Die Lactat-Dehydrogenase katalysiert den letzten Schritt der Glykolyse:

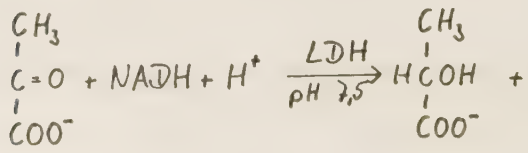
$$\text{Pyruvat} + \text{NADH} + \text{H}^+ \overset{\text{LDH}}{\rightleftharpoons} \text{Lactat} + \text{NAD}^+$$

Das Gleichgewicht der reversiblen Reaktion liegt bei physiologischem pH auf der Seite der Lactatbildung[72].

a) Referenzmethode
Kinetischer UV-Test
Optimierte Standardmethode (LDH opt.) nach den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klische Chemie.

Prinzip:
Die LDH katalysiert die $NADH_2$-abhängige Reduktion von Pyruvat zu Lactat unter Bildung von NAD^+. Meßgröße ist $NADH_2$, die Geschwindigkeit der $NADH_2$-Abnahme ist der LDH-Aktivität proportional[85]. Die Extinktionsabnahme wird bei 340 nm gemessen.

Reaktionsgleichung:



Pyruvat Lactat

Meßbedingungen:

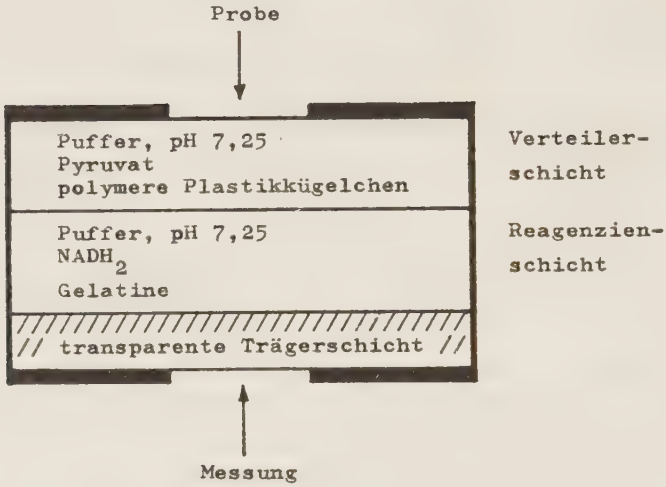
Chem.Funktion	Substanz	Endkonzentrationen im Test
Puffer	Phosphat-Puffer, pH 7,5	50 mmol/l
Substrat	Pyruvat	0,6 mmol/l
Coenzym	$NADH_2$	0,18 mmol/l

Meßtemperatur	25 Grad C
Wellenlänge	340 nm
Probenmaterial	Serum
Probenvolumen	10 µl
Verdünnungsgrenze	1200 U/l
Verdünnung mit physiol. Kochsalzlösung 1:5	

Anmerkung:
Nach Richterich (1978) ist die Bestimmung der LDH im Serum die unzuverlässigste und am schwierigsten zu reproduzierende Enzymanalyse. Das Problem liegt darin, daß sich die LDH aus fünf Isoenzymen zusammensetzt, die alle verschiedene optimale Reaktionsbedingungen aufweisen. Je nach Wahl der $NADH_2$- und Pyruvatkonzentration werden einzelne dieser Isoenzyme gehemmt. Da die Isoenzymzusammensetzung bei pathologischen Seren sehr unterschiedlich ist, ist es unmöglich, von "optimalen" Reaktionsbedingungen für die Serumlactat-Dehydrogenase zu sprechen.

b) EKTACHEM-Methode

Querschnitt durch das LDH-Plättchen:



Prinzip:
Analog der Referenzmethode erfolgt die "trockenchemische" Bestimmung über die Umsetzung von Pyruvat und $NADH_2$ zu Lactat und NAD^+. In der Verteilerschicht, die in diesem Falle hauptsächlich aus polymeren Kügelchen mit einem Durchmesser von 20-40 µm besteht, befindet sich das Pyruvat, die Reagenzschicht enthält in einer Gelatine-Matrix $NADH_2$ und einen Puffer[79]. Aus der Oxidationsrate des $NADH_2$, reflexionsphotometrisch bei 340 nm gemessen, wird die LDH-Aktivität errechnet[32].

Reaktionsgleichung:

$$\text{Pyruvat} + \text{NADH} + H^+ \xrightarrow{\text{LDH}} \text{Lactat} + \text{NAD}^+$$

Meßbedingungen:

Meßtemperatur	37 Grad C
Wellenlänge	340 nm
Versuchszeit	max. 5 Minuten
Meßbereich	100-1750 U/l
Probenmaterial	Serum, Plasma (10 µl)

Anmerkung:
Da die LDH-Aktivität in Serumproben relativ instabil ist, sollten diese entweder sofort analysiert oder gekühlt werden[32].

Gamma - Glutamyltransferase
(GGT; EC 2.3.2.2.)

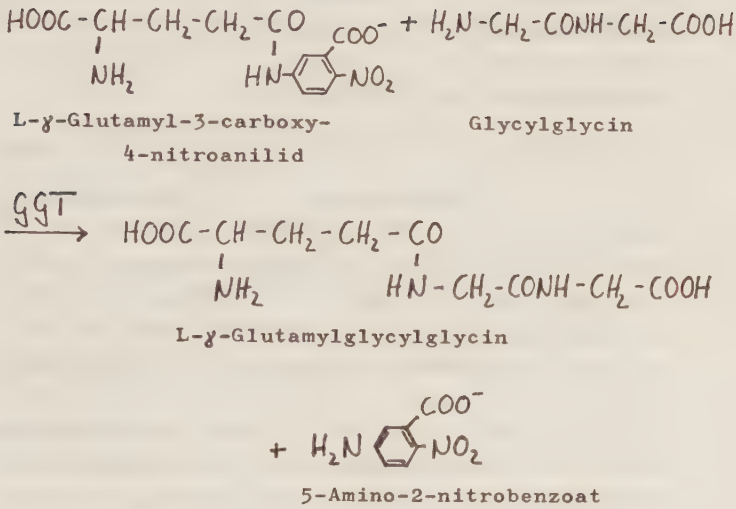
Das Enzym GGT überträgt den Glutamylrest von Peptiden auf L-Aminosäuren oder andere Peptide. Das bekannteste Peptid ist das Glutathion, das wahrscheinlich auch das natürliche Substrat darstellt[72].

Glutathion + Aminosäure $\xrightarrow{GGT}$ γ-Glutamyl-Aminosäure + Cysteinylglycin

a) Referenzmethode
Kinetischer Test nach Szasz et al.(1974) und Persijn et al.(1976)

Prinzip:
Das Enzym wird mit γ-Glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilid inkubiert. Die GGT katalysiert die Übertragung des Glutamylrestes von γ-Glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilid auf Glycylglycin unter Freisetzung von 5-Amino-2-nitrobenzoat. Unter standardisierten Bedingungen ist die Konzentrationszunahme dieser Substanz - gemessen als Absorptionsänderung - proportional der Enzymaktivität im Ansatz[85].
Die Messung der Extinktion erfolgt bei 415 nm.

Reaktionsgleichung:



Meßbedingungen:

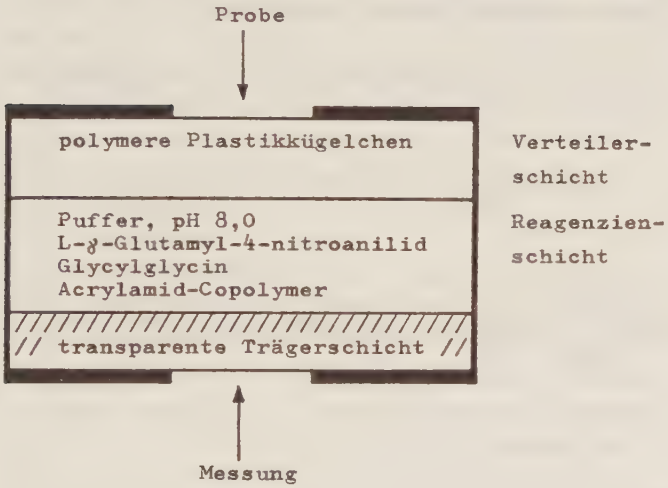
Chem. Funktion	Substanz	Endkonzentrationen im Test
Puffer	Tris-Puffer, pH 8,25	100 mmol/l
Substrat	L-γ-Glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilid	2,9 mmol/l
Akzeptor	Glycylglycin	100 mmol/l

Meßtemperatur	25 Grad C
Wellenlänge	415 nm
Probenmaterial	Serum
Probenvolumen	10 µl
Verdünnungsgrenze	1200 U/l
Verdünnung mit physiolog. Kochsalzlösung 1:5	

Anmerkung:
Ohne Glycylglycin als γ-Glutamyl-Akzeptor entsteht eine Transpeptidierung, die zur Bildung von Polyglutamylpolymeren führt, außerdem tritt eine Hydrolyse zu Glutamat und 5-Amino-2-nitrobenzoesäure ein.
Die Wasserlöslichkeit des ursprünglich verwendeten Substrates γ-Glutamyl-p-nitroanilid konnte durch Substitution von Carboxy- oder Sulfongruppen erhöht werden. Deswegen wird dieses carboxylierte Substrat trotz der Hemmwirkung, die es bei höheren Konzentrationen auf die GGT ausübt, heute bevorzugt[72].

b) EKTACHEM-Methode

Querschnitt durch das GGT-Plättchen:

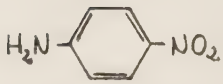


Prinzip:
Die Verteilerschicht des GGT-Plättchens besteht aus winzigen Plastikkügelchen von ca 20 µm Durchmesser, die durch eine Mischung polymerer Bindemittel zusammengehalten werden. Nach Aufgabe der Probe katalysiert das Enzym GGT den Transfer des γ-Glutamylrestes von dem Donatorsubstrat L-γ-Glutamyl-p-nitroanilid auf das Akzeptorsubstrat Glycylglycin, die sich beide - eingebettet in eine Matrix aus Acrylamid-Copolymer - in der Reagenzschicht befinden[22].

Einziger Unterschied zur Referenzmethode ist also die fehlende Carboxylierung des Donatorsubstrats. Gemessen wird die Bildungsrate des entstehenden p-Nitroanilins bzw. die daraus resultierende Änderung der Reflexionsdichte bei 400 nm. Sie ist der GGT-Aktivität proportional[30].

Reaktionsgleichung:

L-γ-Glutamyl-p-nitroanilid + Glycylglycin $\xrightarrow{GGT}$



+ L-γ-Glutamylglycylglycin

p-Nitroanilin

Meßbedingungen:

Meßtemperatur	37 Grad C
Wellenlänge	400 nm
Versuchszeit	max. 5 Minuten
Meßbereich	5 - 1400 U/l
Probenmaterial	Serum, Plasma (10 µl)

α- Amylase
(EC 3.2.1.1.)

Die α-Amylase spaltet die 1,4-glucosidischen Bindungen im Innern von Polysaccharidmolekülen ungeordnet, d.h. nicht wie die pflanzlichen β-Amylasen vom Kettenende her. Es entstehen dabei Bruchstücke von verschiedenster Größe. Das pH-Optimum dieser Reaktion liegt zwischen 6,7 und 7,5[72].

a) Referenzmethode

Laut Thomas (1984) wurden bisher etwa 200 verschiedene Methoden zur Bestimmung der α-Amylase entwickelt. Eine Standardmethode gibt es nicht. Wegen der höheren Präzision sind heute jedoch chromogene Reaktionen mit synthetischen Farbpolysaccharidkomplexen den amyloklastischen und saccharogenen Methoden vorzuziehen. Dabei werden durch die Amylase aus den nichtwasserlöslichen Polysacchariden mit kovalent gebundener Farbstoffgruppe wasserlösliche Fragmente mit daran gebundener Farbstoffgruppe abgespalten, die nach Beendigung der Inkubation im Überstand photometrisch gemessen werden[72].

Enzymatischer Farbtest mit p-Nitrophenyl-α,D-maltoheptaosid als Substrat

Prinzip:

α-Amylase spaltet p-Nitrophenyl-Oligosaccharide, hier p-Nitrophenyl-α,D-maltoheptaosid, in p-Nitro-

phenylmaltosid und Glucose(1). Durch weitere α-Glucosidase katalysierte Spaltung wird gelbes p-Nitrophenol vom p-Nitrophenylmaltosid freigesetzt(2) und bei 405 nm gemessen[85].

Reaktionsgleichungen: (vereinfacht)

(1) 3 p-Nitrophenylmaltoheptaosid + 3 H_2O $\xrightarrow{\alpha\text{-Amylase}}$

2 p-Nitrophenylmaltotetraosid + 2 Maltotriose + p-Nitrophenylmaltotriosid + Maltotetraose

(2) p-Nitrophenylmaltotriosid + 3 H_2O $\xrightarrow{\alpha\text{-Glucosidase}}$

+ 3 Glucose

p-Nitrophenol

Meßbedingungen:

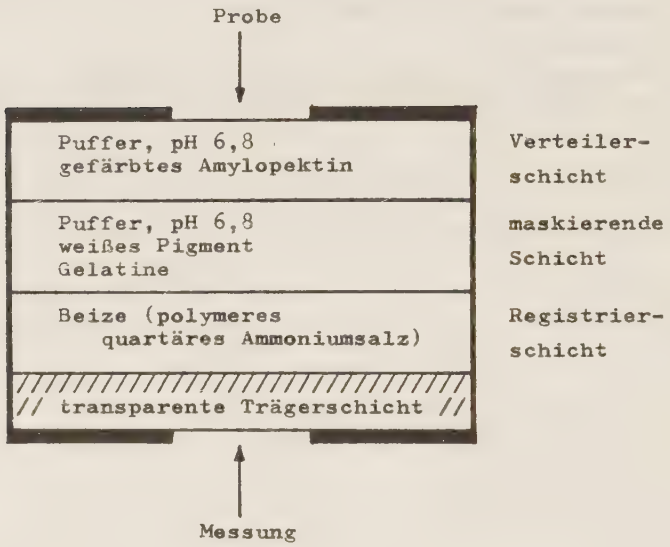
Chem. Funktion	Substanz	Endkonzentrationen im Test
Puffer	Phosphat-Puffer, pH 7,1	100 mmol/l
	Na Cl	50 mmol/l
Substrat	p-Nitrophenylmaltoheptaosid	5 mmol/l
Enzym	α-Glucosidase	≥ 30 U/ml

Meßtemperatur	25 Grad C
Wellenlänge	415 nm
Probenmaterial	Serum
Probenvolumen	10 µl
Verdünnungsgrenze	1300 U/l

Verdünnung mit physiol.Kochsalzlösung 1:11

b) EKTACHEM-Methode

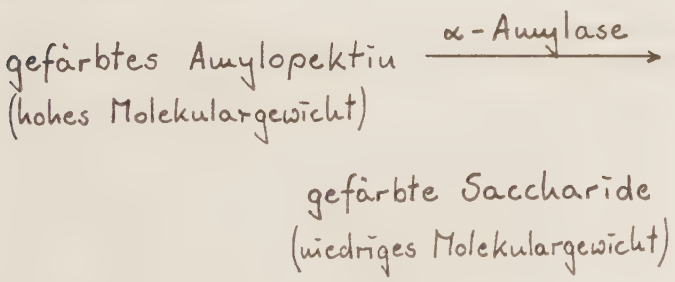
Querschnitt durch das AMYL-Plättchen:



Prinzip:
Da die α-Amylase wegen ihrer Molekülgröße nicht aus der Verteilerschicht herausdiffundieren kann, müssen die zu ihrer Bestimmung notwendigen Reaktionen bereits hier ablaufen.
Als Substrat dient Amylopektin,- neben Amylose der zweite Bestandteil von Stärke und chemisch besser zu definieren als diese - an das kovalent ein Magentafarbstoff gebunden wird. Das ursprünglich wasserunlösliche Amylopektin wird dadurch

wasserlöslich[81]. Die α-Amylase katalysiert nun die hydrolytische Spaltung des gefärbten Amylopektins von hohem Molekulargewicht in kleinere gefärbte Saccharide[26]. Erst diese kleinen Bruchstükke von einer Größe bis zu etwa 10 Glucoseeinheiten können aus der Verteilerschicht heraus- und durch eine daran anschließende maskierende Schicht hindurchdiffundieren, um schließlich in der Registrierschicht einen Komplex zu bilden. Die maskierende Schicht enthält, eingebettet in Gelatine, einen Puffer und ein weißes Pigment und hat zwei Aufgaben zu erfüllen. Einmal muß sie das gefärbte Substrat in der Verteilerschicht verdecken, zum anderen einen weißen Hintergrund für die Reflexionsmessungen bereitstellen. In der Registrierschicht befindet sich ein kationisches hydrophobes Polymer, genannt Beize, das die freigesetzten anionischen Farbteilchen bindet[81].
In einer Endpunktmessung wird die Änderung in der Reflexionsdichte bei 555 nm bestimmt. Der Absorptionsanstieg ist der Amylase-Aktivität proportional.

Reaktionsgleichung:



Meßbedingungen:

Meßtemperatur	37 Grad C
Wellenlänge	555 nm (grüne LED)
Versuchszeit	ca 5,2 Minuten
Meßbereich	15-900 U/l
Probenmaterial	Serum,(Plasma), Urin (10 µl)

Gesamt - Bilirubin

Bilirubin, ein Abbauprodukt überwiegend des Hämoglobins, kommt im Plasma in verschiedenen molekularen Formen vor, zum einen als Bilirubinester (Mono- und Diglucuronid), zum anderen als nichtverestertes Bilirubin. Die Glucuronide sind wasserlöslich, das nichtveresterte Bilirubin ist wasserunlöslich und zudem relativ fest an Plasmaproteine, besonders an Albumin, gebunden[72].

a) Referenzmethode

Diazoniumsalze reagieren mit bestimmten organischen Verbindungen wie Bilirubin zu farbigen Azoverbindungen. Es gibt eine große Zahl von Modifikationen zur Bestimmung des Bilirubins als Azofarbstoff.

DPD-Methode

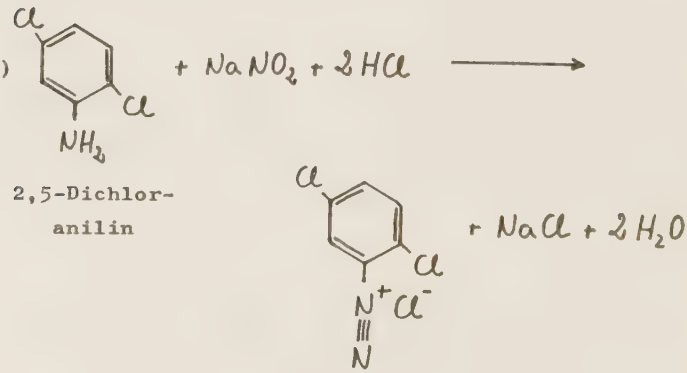
Mit dieser Methode nach Wahlefeld et al.(1972) kann lediglich Gesamt-Bilirubin (T-BIL) ermittelt werden. Eine Bestimmung des direkten (veresterten) Bilirubins allein ist nicht möglich.

Prinzip:

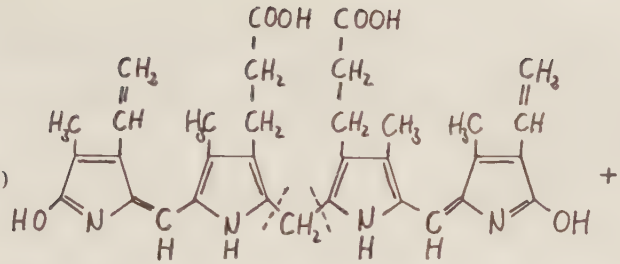
Gesamtbilirubin wird in Gegenwart eines Detergenzes mit einem 2,5-Dichlorphenyl-Diazoniumsalz(DPD) zu dem entsprechenden Azobilirubin gekuppelt[5]. Bei dieser Methode ist die Reagenzherstellung besonders vereinfacht, da die Diazotierung(1), d.h. die Einwirkung von salpetriger Säure(Nitrit) in saurem Milieu auf das Salz eines aromatischen Amins, hier 2,5-Dichloranilin, schon vorher durchgeführt wurde und bereits das Diazoniumsalz vor-

liegt. Der Mechanismus der Farbstoffbildung ist etwas unterschiedlich, je nachdem, um welches Bilirubinderivat es sich handelt. Eine direkte Reaktion ergeben nur die Bilirubinester. Erst das Detergenz, als Akzelerator, bewirkt die Entkopplung der Bilirubin-Albumin-Bindung und somit kann auch indirektes (nichtverestertes) Bilirubin erfaßt werden. In jedem Fall bilden sich in der Kupplungsreaktion(2) mit dem 2,5-Dichlorphenyldiazoniumchlorid in zwei Schritten aus einem Mol Bilirubinderivat zwei Mol roter Azofarbstoff merengemisch), dessen Farbintensität proportional der Bilirubin-Konzentration ist und bei 546 nm gemessen wird[12,5].

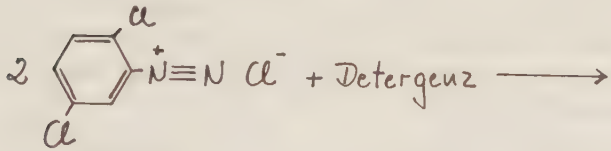
Reaktionsgleichungen:

(1) 

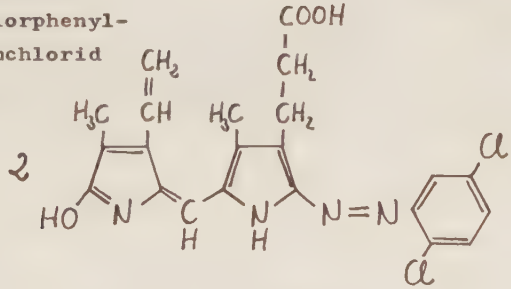
(2)



Bilirubin (nichtverestert)



2,5-Dichlorphenyl-
diazoniumchlorid



roter Azofarbstoff

Meßbedingungen:

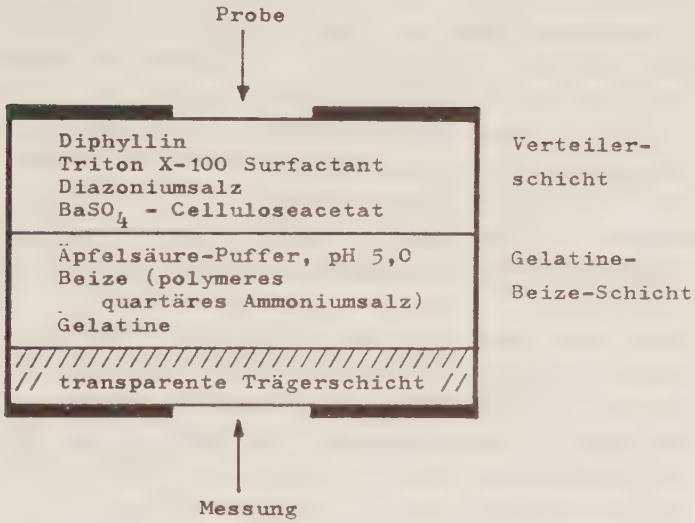
Chem. Funktion	Substanz	Endkonzentrationen im Test
Diazoreagenz	2,5-Dichlorphenyl-diazoniumsalz (DPD)	0,98 mmol/l
Akzelerator	Detergenz / Salzsäure	98 mmol/l

Meßtemperatur	25 Grad C
Wellenlänge	546 nm
Probenmaterial	Serum
Probenvolumen	10 µl
Verdünnungsgrenze	20 mg/dl
Verdünnung mit physiol.Kochsalzlösung 1:3	

Anmerkung:
Die Bestimmung sollte möglichst sofort durchgeführt werden und die Probe muß vor Licht und Hitze geschützt werden, da sonst zu niedrige Werte gemessen werden.
In hämolytischen Seren werden zu niedrige Werte gefunden, da Hämoglobinderivate eine hemmende Wirkung auf die Farbstoffbildung haben[22].
Durch starke Trübungen, z.B. bei Lipämie, können zu hohe Werte vorgetäuscht werden[5].

b) EKTACHEM-Methode

Querschnitt durch das TBIL-Plättchen:



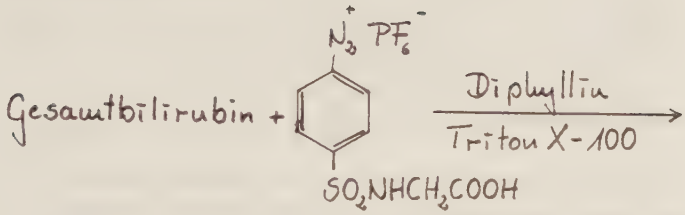
Prinzip:
Der verwendete Test ist eine Adaptation des Jendrassik-Grof-Verfahrens - also der Bestimmung des Bilirubins als Azofarbstoff - an trockenchemische Verhältnisse[72] und im Prinzip der Referenzmethode analog.
Die weiße, reflektierende Verteilerschicht ($BaSO_4$-Celluloseacetat) des Analysenplättchens enthält alle erforderlichen Reagenzien. Sämtliche Bilirubinfraktionen reagieren mit dem Diazoniumsalz 4-(N-carboxymethylsulfamyl)-benzol-diazoniumhexafluorophosphat zu dem jeweiligen Azobilirubin.

Nichtverestertes Bilirubin muß dazu zunächst aus seiner Bindung an Plasmaproteine freigesetzt werden. Dies geschieht durch Diphyllin, wobei die Verdrängung aus der Eiweißbindung durch Anionen erfolgt[72] und durch das nichtionische Surfactant Triton X-100. Mono- und diglucuroniertes Bilirubin, sowie die sehr fest an Albumin gebundene Deltafraktion reagieren direkt zu farbigen Azoverbindungen, die alle ihr Absorptionsmaximum bei etwa 520 nm haben. Diese Farbstoffe wandern aus der Verteilerschicht in die darunterliegende auf pH 5,0 abgepufferte Gelatine-Beize-Schicht, wo sie an ein polymeres quartäres Ammoniumsalz (die Beize) gebunden werden[19].

Durch diese Anlagerung des Bilirubins an das kationische Polymer befindet es sich in einer hydrophoberen Umgebung und zeigt Absorptionskurven ähnlich denen in nichtwäßrigen Lösungen[81]. Der Anstieg der Absorption um das 2 - 2,5fache erlaubt eine genauere Messung auch geringer Bilirubinkonzentrationen (< 1 mg/dl) und erhöht somit die Empfindlichkeit des Trockenreagenzträgers[18].

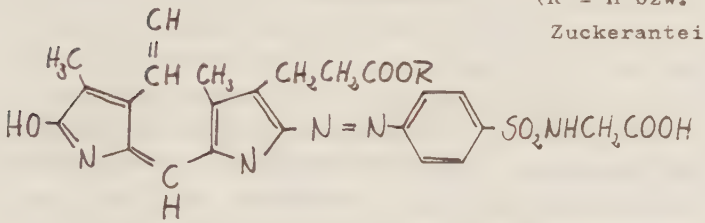
Die Menge der sich bildenden roten Azofarbstoffe ist der Gesamt-Bilirubin-Konzentration proportional. Ihre Farbintensität wird nach fünfminütiger Inkubationszeit durch Reflexionsdichtemessung bei 540 nm ermittelt[35].

Reaktionsgleichung:



Diazoniumsalz

(R = H bzw. Zuckeranteil)



rotes Azobilirubin (Isomerengemisch)

Meßbedingungen:

Meßtemperatur	37 Grad C
Wellenlänge	555 nm (grüne LED)
Versuchszeit	ca 5,2 Minuten
Meßbereich	0,1 - 20,0 mg/dl
Probenmaterial	Serum, Plasma (10 µl)

Anmerkung:
Die Ergebnisse einzelner Proben können durch Verbindungen, die Licht im Bereich der Meßwellenlänge von 555 nm absorbieren, beeinflußt werden[35]. Hämoglobin kann sowohl zu positiven (sein Absorptionsspektrum überschneidet sich mit demjenigen der Azofarbstoffe) als auch zu negativen (Störung der Azokupplung) Abweichungen führen[92].

Glucose

a) Referenzmethode

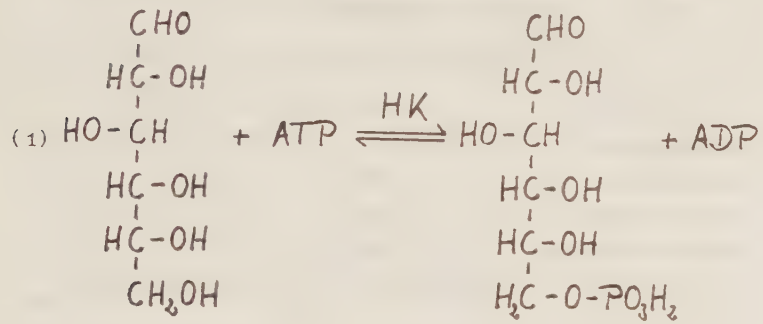
Als Referenzmethode für die Glucosebestimmung ist heute international die Hexokinase-Methode anerkannt, deren bemerkenswert hohe Spezifität in erster Linie auf der Kopplung zweier enzymatischer Reaktionsschritte beruht. Durch die Kombination der Hexokinase mit dem außerordentlich selektiven Enzym Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase wird erreicht, daß selbst chemisch sehr ähnliche Verbindungen die Glucosebestimmung nicht stören. Außerdem zeichnet sich die Methode durch sehr gute Präzision und Richtigkeit aus, ist rasch durchführbar und benötigt keine Enteiweißung[9].

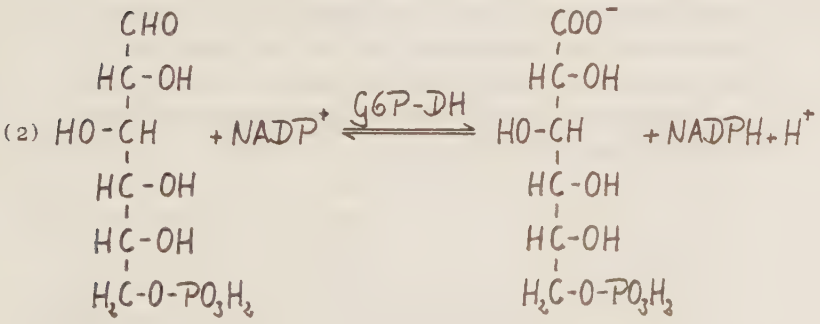
Hexokinase-Methode (UV-Test)
nach Schmidt (1961)

Prinzip:
Im ersten Reaktionsschritt wird Glucose mit ATP durch die Hexokinase(HK) zu Glucose-6-Phosphat phosphoryliert(1). Dieses reagiert anschließend mit $NADP^+$ unter der Einwirkung von Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) und es entstehen 6-Phosphogluconat und $NADPH_2$(2). Ein Molekül gebildetes $NADPH_2$ entspricht einem Molekül Glucose, falls ATP, Hexokinase, $NADP^+$ und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase im Überschuß vorliegen[22].

Die $NADPH_2$-Zunahme wird bis zum Stillstand der Reaktion, d.h. bis zur vollständigen Umwandlung der Glucose in 6-Phosphogluconat, photometrisch bei 340 nm gemessen (Endpunktmethode). Die ermittelte Extinktionszunahme ist der ursprünglichen Glucosekonzentration proportional[85].

Reaktionsgleichungen:





Meßbedingungen:

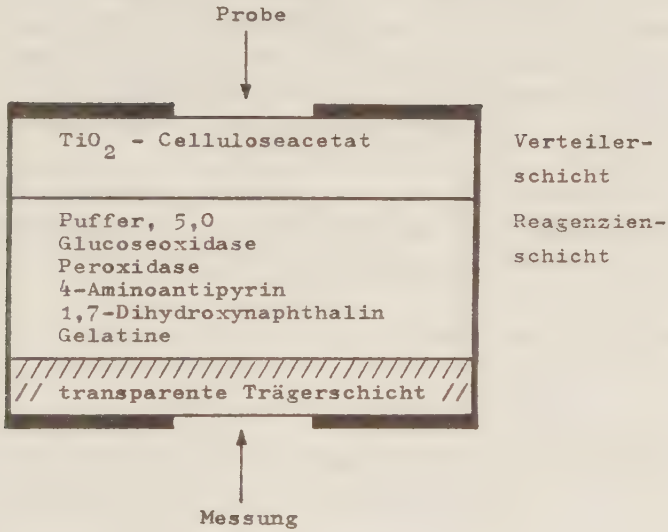
Chem.Funktion	Substanz	Endkonzentrationen im Test
Puffer	Phosphat-Puffer, pH 7,7	69,5 mmol/l
	Mg^{++}	3,97 mmol/l
Coenzyme	ATP	1,29 mmol/l
	$NADP^{+}$	1,29 mmol/l
Enzyme	Hexokinase	≥11 U/l
	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	≥1,9 U/l

Meßtemperatur	25 Grad C
Wellenlänge	340 nm
Probenmaterial	Serum
Probenvolumen	3 µl
Verdünnungsgrenze	900 mg/dl
Verdünnung mit physiol.Kochsalzlösung 1:3	

Anmerkung:
Das Serum sollte möglichst sofort, spätestens eine Stunde nach der Blutabnahme von zellulären Bestandteilen abgetrennt werden, da bereits 3o Minuten nach der Probennahme mit einem Glucoseabfall (Glykolyse in den Erythrozyten) von 6-7% zu rechnen ist[9].

b) EKTACHEM-Methode

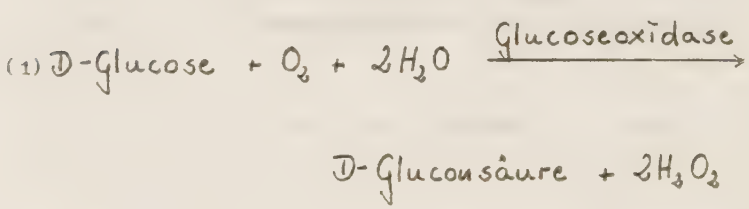
Querschnitt durch das GLU-Plättchen:

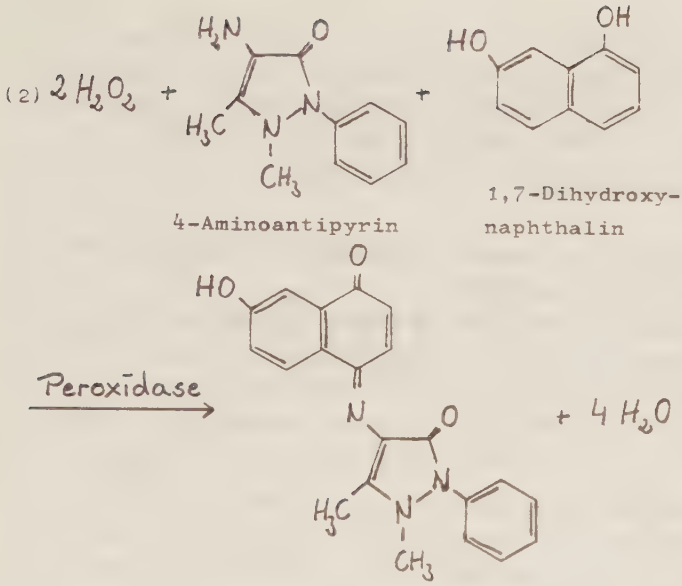


Prinzip:
Die Bestimmung der Glucose erfolgt voll enzymatisch mit Glucoseoxidase/Peroxidase (GOD/POD-Methode). Das Glucoseplättchen war der erste Trokkenreagenzträger - quasi der Prototyp - dieser Mehrschichtentechnologie mit einer Verteilerschicht, die, wie bei den meisten später entwickelten Analysenplättchen auch, aus einer Celluloseacetatmatrix mit eingelagertem Titandioxid als reflektierendem Pigment besteht. Alle Reaktionen laufen

in der darunterliegenden Reagenzienschicht ab. Zunächst katalysiert die Glucoseoxidase (GOD) die Oxidation von D-Glucose zu D-Gluconsäure und Wasserstoffperoxid (1). Dieser Reaktion folgt eine oxidative Kupplung von 4-Aminophenazon (4-Amino-Antipyrin) und 1,7-Dihydroxynaphthalin, katalysiert durch Peroxidase (POD), bei der ein roter Naphthochinonfarbstoff entsteht (2). Diese Indikatorreaktion geht zurück auf Trinder, der ursprünglich Phenol/4-Amino-phenazon (PAP) verwendete[16].
Die Farbintensität ist von der Glucosekonzentration abhängig und wird nach Ablauf der Inkubationszeit mittels Reflexion bei 555 nm gemessen[24].

Reaktionsgleichungen:





4-Aminoantipyrin

1,7-Dihydroxy-naphthalin

roter Naphthochinonfarbstoff

Meßbedingungen:

Meßtemperatur	37 Grad C
Wellenlänge	555 nm (grüne LED)
Versuchszeit	ca 5,2 Minuten
Meßbereich	20 - 450 mg/dl
Probenmaterial	Serum, Plasma, Urin,Liquor(10 µl)

Anmerkung:
Als Nachteil dieses Verfahrens gegenüber der Hexokinase-Methode ist zu erwähnen, daß zwar die GOD fast absolut spezifisch auf Glucose ist, jedoch die Indikatorreaktion mit POD relativ wenig Spezifität besitzt und durch zahlreiche Substanzen gestört werden kann[72].

Harnstoff

a) Referenzmethode

Eine Reihe von Methoden zur Harnstoffbestimmung finden heute Anwendung.
Grundlage der modernen photometrischen Tests ist der enzymatische Abbau von Harnstoff durch das Enzym Urease. Diese Bestimmung ist sehr spezifisch, da Harnstoff die einzige körpereigene Verbindung ist, die von der Urease gespalten wird.

Die enzymatische Bestimmung des Ammoniaks mit Glutamat-Dehydrogenase mit Hilfe des optischen Tests ist die einzige Methode, die eine Absolutmessung von Ammoniumionen erlaubt und gilt daher als Referenzmethode[72].
Die Kombination der beiden Enzyme Urease und Glutamat-Dehydrogenase zur Messung des Harnstoffs im optischen Test stellt somit ein elegantes Prinzip dar, das sich durch hohe Spezifität auszeichnet. Außerdem kann die Methode direkt, d.h. ohne vorherige Enteiweißung, verwendet werden.

Vollenzymatischer UV-Test
nach Gutmann et al. (1974)

Prinzip:
Die Urease spaltet den Harnstoff in Ammoniak und Kohlendioxid(1). Das gebildete Ammoniak wird anschließend mit α-Ketoglutarat, $NADH_2$ und Glutamat-Dehydrogenase(GLDH) umgesetzt(2) und in die-

ser Reaktion quantitativ erfaßt.
Meßgröße ist die Abnahme der Absorption von $NADH_2$.
Sie wird photometrisch nach dem Endwert-Verfahren, also nach vollständiger Umsetzung des Substrates α-Ketoglutarat, bei 376 nm gemessen[12].

Reaktionsgleichungen:

(1) $$\begin{matrix} H_2N \\ H_2N \end{matrix}\!\!>C=O + H_2O \xrightarrow{\text{Urease}} 2NH_3 + CO_2$$

Harnstoff

(2) $$2NH_3 + 2\begin{matrix} COO^- \\ | \\ C=O \\ | \\ CH_2 \\ | \\ CH_2 \\ | \\ COO^- \end{matrix} + 2NADH + H^+ \xrightarrow{\text{GLDH, ADP}}$$

α-Ketoglutarat

$$2\begin{matrix} COO^- \\ | \\ HC-NH_2 \\ | \\ CH_2 \\ | \\ CH_2 \\ | \\ COO^- \end{matrix} + 2NAD^+ + 2H_2O$$

L-Glutamat

Meßbedingungen:

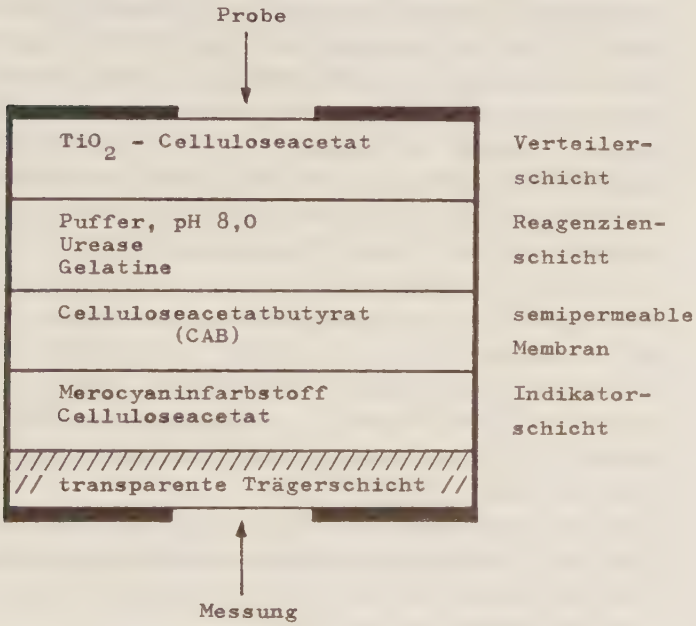
Chem. Funktion	Substanz	Endkonzentrationen im Test
Puffer	Triäthanolamin-Puffer, pH 8,0	45 mmol/l
Substrat	α-Ketoglutarat	4,1 mmol/l
Coenzyme	$NADH_2$	0,53 mmol/l
	ADP	0,45 mmol/l
Enzyme	Urease	≥11 U/l
	Glutamat-Dehydrogenase	≥6,7 U/l

Meßtemperatur	25 Grad C
Wellenlänge	376 nm
Probenmaterial	Serum
Probenvolumen	5 µl
Verdünnungsgrenze	160 mg/dl
Verdünnung mit physiol. Kochsalzlösung 1:3	

Anmerkung:
Der ADP-Zusatz verhindert die Inaktivierung von GLDH und erhöht deren Umsatzgeschwindigkeit[72].

b) EKTACHEM-Methode

Querschnitt durch das UREA-Plättchen:

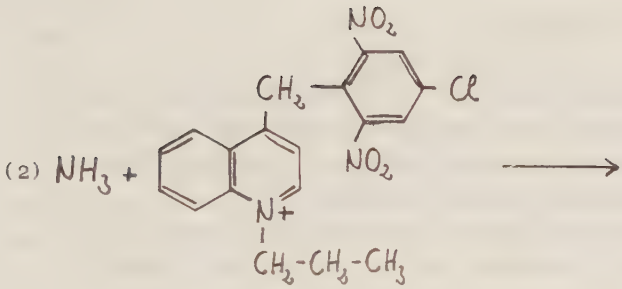


Prinzip:
Wie bei der Bezugsmethode basiert die Bestimmung auf der sehr spezifischen enzymatischen Hydrolyse des Harnstoffs durch Urease (1). Die Urease wurde im Überschuß in die Gelatinematrix der Reagenzienschicht eingebracht, besitzt also sehr große Aktivität und spaltet den Harnstoff rasch und vollständig. Dabei freigesetztes Ammoniak diffundiert durch

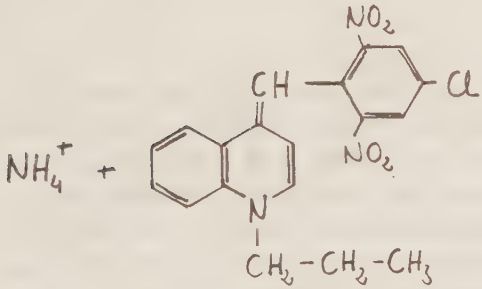
eine semipermeable Membran in die darunterliegende Indikatorschicht. Diese Membran, bestehend aus Celluloseacetatbutyrat (CAB), ist hochselektiv für Ammoniak und hält Hydroxidionen zurück. Der verwendete Indikator N-propyl-4-(2,6-dinitro-4-chlorbenzyl)-methyl-chinolin, ein Merocyaninfarbstoff, liegt in protonierter Form vor und reagiert ebenfalls nur mit freiem Ammoniak, nicht aber mit Ammoniumionen (2). Diese Kombination von semipermeabler Membran und Indikatorschicht erlaubt eine spezifische Bestimmung des gebildeten Ammoniaks. Entscheidend ist auch eine ausreichend hohe Pufferkonzentration in der Reagenzienschicht, um alle Proben auf den gleichen End-pH zu bringen, da das NH_3/NH_4^+ - Gleichgewicht sehr empfindlich auf pH - Schwankungen reagiert. Bei dem gewählten pH von 8,0 liegt dieses Gleichgewicht mehr auf Seiten der Ammoniumionen, es wird also weniger Ammoniak frei und somit weniger Indikator benötigt, um ihn zu binden[81].
Nach festgesetzter Zeit wird die entstandene Färbung kolorimetrisch durch Reflexionsspektroskopie bei 660 nm gemessen und die ursprüngliche Harnstoffkonzentration errechnet[37].

Reaktionsgleichungen:

$$(1)\quad H_2NCONH_2 + H_2O \xrightarrow[pH\,8]{Urease} 2\,NH_3 + CO_2$$



Ammoniak-Indikator



Merocyaninfarbstoff

Meßbedingungen:

Meßtemperatur	37 Grad C
Wellenlänge	660 nm (rote LED)
Versuchszeit	ca 5,2 Minuten
Meßbereich	10 - 214 mg/dl
Probenmaterial	Serum, Plasma, Urin (10 µl)

Gesamt - Eiweiß

Es gibt mehr als 100 verschiedene Plasmaproteine, den größten Teil des Gesamt-Eiweißes im Serum nehmen aber Albumine und Globuline ein. Plasma enhält zusätzlich Fibrinogen.
Die Höhe des Gesamt-Eiweißspiegels hängt von der Menge der Proteine und der Größe des Plasmavolumens ab[8].

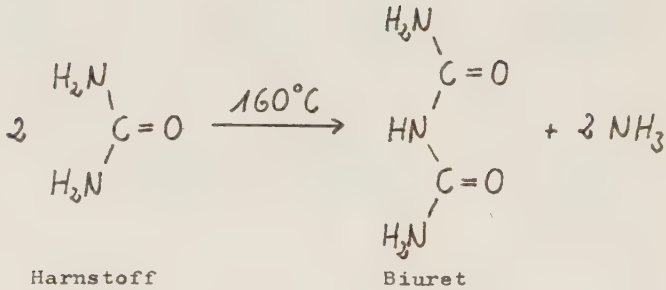
a) Referenzmethode

Eine Vielzahl physikalischer und chemischer Methoden stehen für die Bestimmung des Gesamtproteins im Serum bzw. Plasma zur Verfügung, allen diesen Techniken ist jedoch die Biuret-Methode überlegen. Sie zeichnet sich aus durch hohe Spezifität, praktisch gleiche Reaktivität mit den wichtigsten Proteinen im Serum / Plasma und geringen Arbeitsaufwand, da nur ein stabiles Reagenz benötigt wird. Ferner ist die Methode wenig störanfällig und liefert auch bei stark pathologischen Plasmen unverfälschte Werte[72].

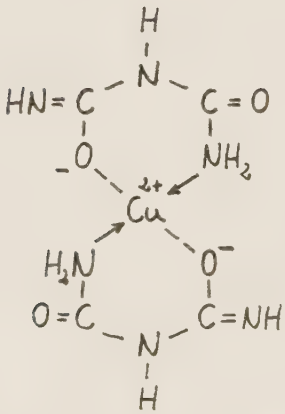
Biuret - Methode
nach Weichselbaum (1946)
Als Referenzmethode vorgeschlagen-auch wenn sie bislang noch nicht standardisiert ist (verschiedene Modifikationen)[85]-und in die "Standard Methods of Clinical Chemistry" der "American Association of Clinical Chemists" aufgenommen[72].

Prinzip:
Anlagerung von Kupfer(II)-Ionen in alkalischer Lösung an die Peptidbindungen von Proteinen und Peptiden. Die Intensität der dabei entstehenden Violettfärbung ist der Zahl der Peptidbindungen über einen weiten Meßbereich direkt proportional. Voraussetzung für die Reaktion ist das Vorhandensein von mindestens zwei Peptidbindungen[85].
Die einfachste Verbindung, die positiv reagiert, ist das Biuret (daher der Name der Methode), das durch Erhitzen von Harnstoff auf 150 - 160 Grad C unter Ammoniakabspaltung hergestellt werden kann (1)[8].
Das Biuret-Reagenz enthält Kupfersulfat, Natrium-Kalium-Tartrat, Kaliumjodid und Natronlauge. Zweiwertiges Kupfer wird im alkalischen Milieu als Tartrat-Komplex in Lösung gehalten, Kaliumjodid verhindert die Autoreduktion von Cu(II)[85].
Die Biuret-Reaktion beruht auf einer Komplexbildung eines Kupfer(II)-Ions mit 4 Peptid-N-Atomen im Alkalischen; so entsteht beispielsweise mit zwei Molekülen Biuret ein Kupfer-Biuret-Komplex von violettroter Färbung (2).
Mit Proteinen bildet sich ein blaugefärbter Kupfer-Protein-Komplex aus, dessen Absorption gegen einen Reagenzienleerwert bei 546 nm gemessen wird. Die Farbintensität ist dem Gesamt-Eiweißgehalt proportional[8].

Reaktionsgleichungen:

(1) 

Harnstoff Biuret

(2) 

Kupfer-Biuret-Komplex

Meßbedingungen:

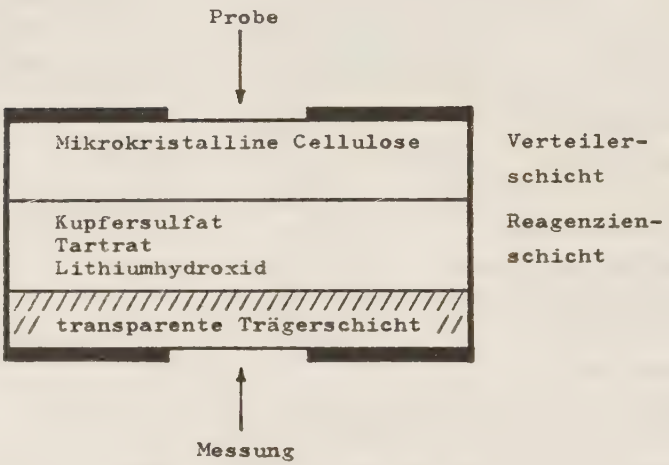
Chem. Funktion	Substanz	Endkonzentrationen im Test
Biuret-Reagenz	Na OH	99 mmol/l
	K-Na-tartrat	25,6 mmol/l
	Kaliumjodid	15 mmol/l
	Kupfersulfat	6 mmol/l

Meßtemperatur	25 Grad C
Wellenlänge	546 nm
Probenmaterial	Serum
Probenvolumen	10 µl
Verdünnungsgrenze	20 g/dl
Verdünnung mit physiolog. Kochsalzlösung 1:3	

Anmerkung:
Die Biuret-Methode ist spezifisch auf Peptide, Polypeptide und Proteine, andere stickstoffhaltige Verbindungen des Serums bzw. Plasmas - wie Ammoniak, Harnstoff, Aminosäuren etc. - reagieren nicht.
Bei Verwendung von ikterischen, hämolytischen oder lipämischen Seren muß zusätzlich ein Probenleerwert mitgeführt werden, dessen Extinktion - gemessen gegen Wasser - von der Probenextinktion abzuziehen ist[8].

b) EKTACHEM-Methode

Querschnitt durch das TP-Plättchen:



Prinzip:
Auch hier kommt die Biuret-Methode zur Anwendung. Anders als bei den bisher besprochenen Analysenplättchen läuft das Arbeitsprinzip des TP-Plättchens jedoch umgekehrt ab, d.h. die Reagenzien wandern hinauf zum Analyten, anstatt der Analyt hinunter zu den Reagenzien. Grund dafür ist das hohe Molekulargewicht der Proteine, weshalb diese bekanntlich in der Verteilerschicht zurückgehalten werden. Sobald nun die Probenflüssigkeit auch in die Reagenzienschicht eingedrungen ist, setzt eine Rückdiffusion des gelösten Kupfertartrats in die Verteilerschicht ein. Dort findet

dann die Reaktion zwischen den Kupfer(II)-Ionen und den Proteinen statt und es bildet sich ein blauvioletter Komplex. In die Verteilerschicht wurde Avicel (mikrokristalline Cellulose) eingebracht, ein Polymer, das Licht weniger stark reflektiert als das üblicherweise verwendete Titandioxid und es somit dem Licht erlaubt, in diese Schicht einzudringen, um von dem Kupfer-Protein-Komplex absorbiert zu werden[75].
Die Konzentration dieses Farbkomplexes ist dem Gesamt-Eiweiß-Gehalt proportional. Seine Reflexionsdichte wird nach einer festgesetzten Inkubationszeit bei 555 nm gemessen (Endpunktbestimmung)[36].

Reaktionsgleichung: (Schema)

$$\text{Protein} + \text{Kupfertartrat} \xrightarrow{\text{LiOH}} \text{gefärbter Kupfer-Protein-Komplex}$$

Meßbedingungen:

Meßtemperatur	37 Grad C
Wellenlänge	555 nm (grüne LED)
Versuchszeit	ca 5,2 Minuten
Meßbereich	2 - 11,0 g/dl
Probenmaterial	Serum,Plasma (10 µl)

Creatinin

Katalysiert durch Creatinkinase wird intramuskulär Creatin zu Creatinphosphat phosphoryliert, das als Energiespeicher dient. Seine chemische Energie wird bei der Muskelkontraktion in mechanische Energie umgewandelt, wobei Creatin, Phosphat und ADP entstehen.
Ein kleiner Teil des Creatinphosphats - täglich etwa 1,5 - 2 % des Körpercreatins - zerfällt spontan zu Creatinin. Dieses gelangt ins Plasma und wird quantitativ in den Urin ausgeschieden[72].

a) Referenzmethode
Lange Zeit war die Bestimmung des Creatinins unbefriedigend, da die Methoden zu unspezifisch waren, um den wahren Creatiningehalt eindeutig zu erfassen[72]. Erst nachdem die Reinherstellung einer bakteriellen Creatininase gelungen war, konnte 1978 ein erster enzymatischer UV-Test entwickelt werden, der spezifisch für Creatinin ist[72]. Durch die Kombination dieser spezifischen enzymatischen Creatininspaltung durch Creatininase mit der inzwischen bei anderen enzymatischen Farbtests bewährten "Phenol-Aminophenazon"-(PAP)-Methode als Indikatorreaktion konnte die Creatininbestimmung noch weiter verbessert werden[7].

Enzymatischer Farbtest, Creatinin PAP
nach Siedel et al. (1984)

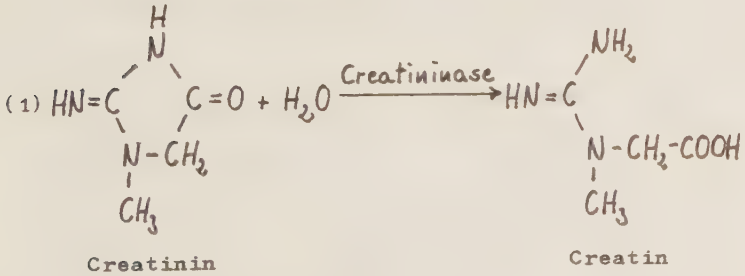
Prinzip:

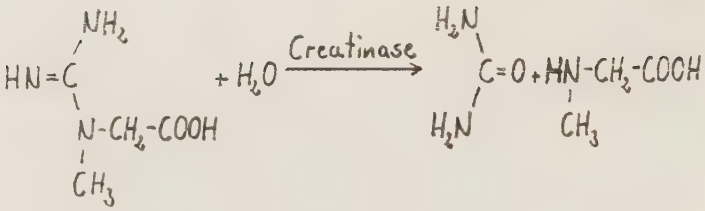
Creatinin wird durch das Enzym Creatininase (Creatinin-amidohydrolase) zu Creatin hydrolysiert(1). Im zweiten Reaktionsschritt katalysiert Creatinase die Spaltung des Creatins in Sarcosin (N-Methyl-Glycin) und Harnstoff (2). Dabei wird auch physiologisch vorkommendes Creatin umgesetzt. Der daraus entstehende Farbanteil muß durch Messung gegen einen Probenleerwert kompensiert werden.

Sarcosin wird durch Sarcosinoxidase in Glycin, Formaldehyd und Wasserstoffperoxid umgesetzt (3), letzteres kuppelt in der durch Peroxidase katalysierten Indikatorreaktion mit Hilfe des Phenolderivats 2,4,6-Tribrom-3-hydroxybenzoesäure (TBHB) und 4-Aminophenazon zu einem roten Benzochinoniminfarbstoff (4), dessen Farbintensität der Creatinin-Konzentration proportional ist[7].

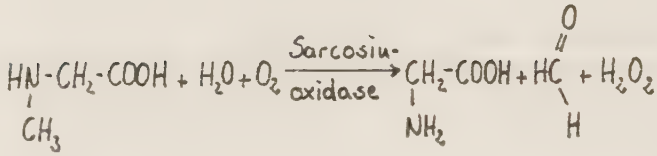
Die Extinktion wird bei 505 nm gemessen.

Reaktionsgleichungen:

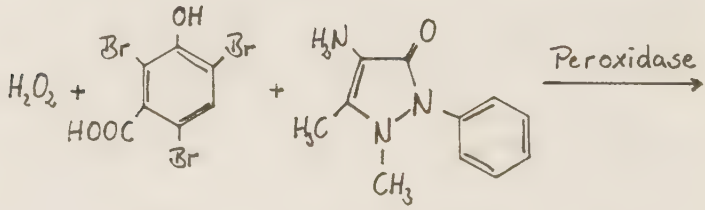


(2) 

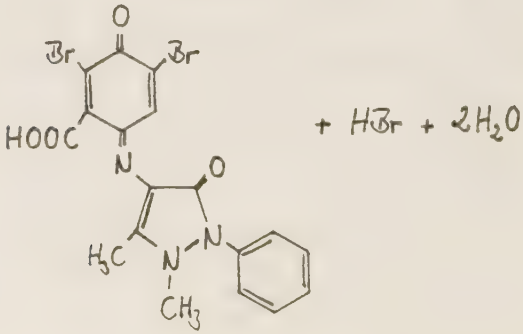
Creatin Harnstoff Sarcosin

(3) 

Sarcosin Glycin Formaldehyd

(4) 

TBHB 4-Aminophenazon



roter Benzochinoniminfarbstoff

Meßbedingungen:

Chem.Funktion	Substanz	Endkonzentrationen im Test
Puffer	Kaliumphosphat-Puffer pH 7,9	85 mmol/l
Substrate	2,4,6-Tribrom-3-hydroxy-benzoesäure	7,0 mmol/l
	4-Aminophenazon	0,65 mmol/l
Enzyme	Creatininase	≥ 26 U/ml
	Creatinase	≥ 16 U/ml
	Peroxidase	≥ 0,81 U/ml
	Sarcosinoxidase	≥ 9,8 U/ml
	Ascorbat-Oxidase	≥ 8,1 U/ml
Inhibitor	Kaliumhexacyanoferrat(II)	4,1 mmol/l
	Detergenz	0,29 %

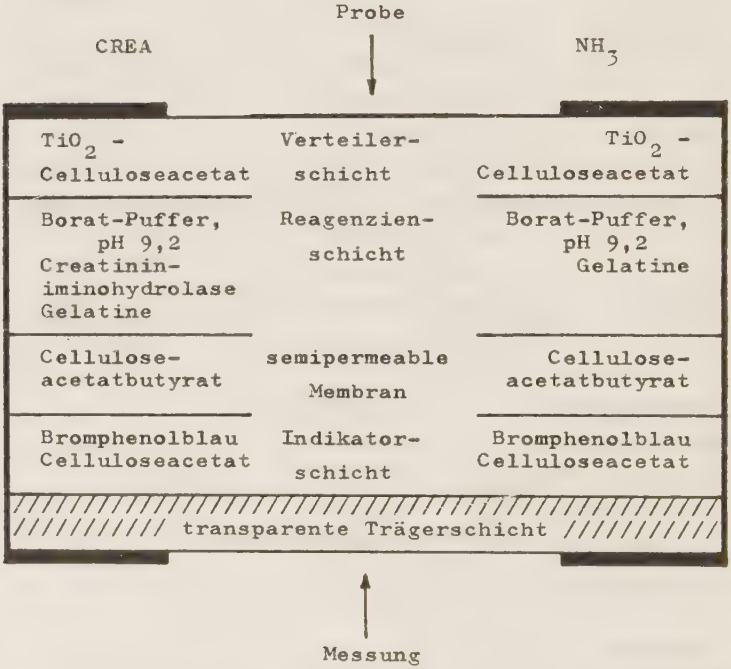
Meßtemperatur	25 Grad C
Wellenlänge	505 nm
Probenmaterial	Serum
Probenvolumen	10 µl
Verdünnungsgrenze	20 mg/dl

Verdünnung mit physiolog. Kochsalzlösung 1:2

Anmerkung:
Das Reagenz enthält ein spezielles Aufhellungssystem, das die störungsfreie Messung hyperlipämischer Seren ermöglicht.
Die im Reaktionsgemisch enthaltene Ascorbat-Oxidase verhindert Störungen durch Ascorbinsäure im therapeutischen Bereich.
Kaliumhexacyanoferrat(II) soll Störeinflüsse durch Bilirubin beseitigen[7].

b) EKTACHEM-Methode

Querschnitt durch das CREA- und durch das NH_3-Plättchen:

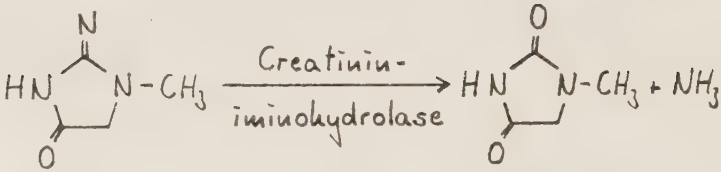


Prinzip:

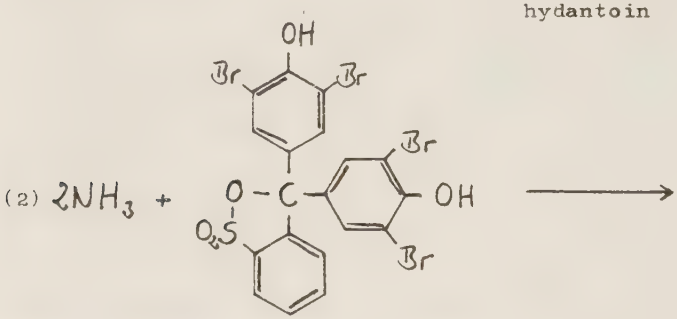
Der Test beruht auf der enzymatischen Hydrolyse des Creatinins durch Creatinin-iminohydrolase in N-Methylhydantoin und Ammoniak (1). Diese Reaktion läuft in der Reagenzienschicht des CREA-Plättchens ab.

Sowohl das in der Enzymreaktion aus Creatinin entstandene als auch endogenes Ammoniak diffundieren anschließend selektiv durch eine semipermeable Membran aus Celluloseacetatbutyrat in die Indikatorschicht aus Celluloseacetat, die Bromphenolblau enthält (vgl. Harnstoffbestimmung). Hier wird freies Ammoniak durch Reaktion mit dem Indikator quantitativ erfaßt (2).
Da das Enzym alkalisches Milieu verträgt, ist der pH der Reagenzienschicht auf 9,2 eingestellt, um so die Transportrate des Ammoniaks durch die semipermeable Membran zu erhöhen (NH_3/NH_4^+-Gleichgewicht auf Seiten des NH_3). Dies und ein Indikatorüberschuß bewirken, daß praktisch das gesamte NH_3 an den Farbstoff gebunden wird. Der dabei entstehende Farbwechsel erfolgt proportional zur Ammoniakkonzentration und das Bromphenolblau erhält ein weiteres Absorptionsmaximum bei ca 600 nm[83]. Die reflexionsphotometrische Messung erfolgt daher bei 605 nm.
Da bei dieser Methode auch endogenes Ammoniak miterfaßt wird, muß dieses als Probenleerwert getrennt bestimmt werden. Dazu wird ein zweites Analysenplättchen(NH_3) identischen Aufbaus, dem lediglich das Enzym fehlt, verwendet. Auf dem Anzeigefeld des Analyzers wird der genaue Zeitpunkt angegeben, zu dem es dem CREA-Plättchen nachgeschoben werden muß.
Die Differenz der Reflexionsdichtemessungen beider Plättchen liefert ein genaues Maß für die Creatininkonzentration in der Probe. Wenn es gewünscht wird, kann die Konzentration des endogenen Ammoniaks auch gesondert (in μmol/l) ausgedruckt werden[29].

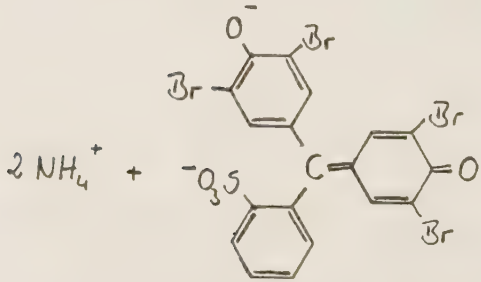
Reaktionsgleichungen:

(1) 

Creatinin N-Methyl-hydantoin

(2) 

Indikator (gelb)



Bromphenolblau (blau)

Meßbedingungen:

Meßtemperatur	37 Grad C
Wellenlänge	605 nm (gelbe LED)
Versuchszeit	ca 5,2 Minuten
Meßbereich	0,1 - 15,0 mg/dl
Probenmaterial	Serum, Plasma, Urin (10 µl)

Anmerkung:
Um eine optimale Ausführung des Tests zu gewährleisten, sollten Creatinin- und Ammoniakbestimmungen nicht durchgeführt werden, solange sich noch Harnstoffplättchen im Inkubator befinden, da bekanntlich auch dieser Test unter Ammoniakbildung abläuft[29]. Außerdem dürfen keine Analysenplättchen anderer Parameter in den Inkubator gelangen, während CREA- oder NH_3-Plättchen bearbeitet werden.
Um die Ammoniakbildung aus den Erythrozyten in der Probe möglichst gering zu halten, sollten Serum bzw. Plasma sofort von den zellulären Bestandteilen abgetrennt und so bald als möglich analysiert bzw. gekühlt werden[29].
Hohe Ammoniakkonzentrationen können die Genauigkeit der Creatininmessung negativ beeinflussen[83].

Nach Toffaletti et al. (1983) wird die einzige signifikante Interferenz durch das Antibiotikum 5-Fluorocytosin hervorgerufen, wobei eine Umwandlung der 4-Aminogruppe in freies NH_3 erfolgt. Andere Medikamente mit Aminogruppen stören nicht. Dies deckt sich mit der Beobachtung von Sundberg et al. (1983), wonach Cytosin und seine

Derivate ein Substrat für das sonst sehr spezifische Enzym Creatinin-iminohydrolase darstellen.

Gerard et al. (1984) fanden, daß hohe Serumglucosewerte (>100 mg/dl) die Ammoniak- und damit auch die Creatininbestimmung behindern können.

Während bei der Ammoniakbestimmung die aus Serum ermittelten Werte nahezu doppelt so hoch wie jene aus Plasma liegen und deshalb nicht austauschbar sind, konnte bei der Creatininbestimmung keine Differenz zwischen Serum und Plasma beobachtet werden[58].

1.2.3. Elektrolytbestimmungen

Die Referenzwertbestimmungen erfolgten mit einem vierkanaligen, computergesteuerten Flammenphotometer, mit dem die Elektrolyte Natrium, Kalium, Calcium und Lithium aus einer Serumprobe bestimmt werden können. Das Gerät arbeitet nach dem internen Standardprinzip, d.h. der Meßlösung wird mit der Verdünnung ein konstanter Anteil des Referenzelementes Lithium zugesetzt. Die Elektrolyte werden mit getrennten Empfängern bestimmt. Lithium dient als interner Standard und die Spannung der Lithium-Fotozelle als Referenzspannung für die anderen Fotozellen. Alle gerätebedingten Instabilitäten - wie Veränderungen der Zerstäubung, des Luft- oder Gasdruckes etc. - wirken sich auf Meß- und Referenzelement annähernd gleich aus. Ändert sich die konstante Referenzspannung, so wird kompensatorisch die Spannung der Fotozelle des gesuchten Elektrolyts um diesen Betrag korrigiert und somit der Einfluß der Instabilität auf das Analysenergebnis beseitigt oder zumindest stark verkleinert[85]. Jeder Meßwert wird aus 50 Einzelmessungen ermittelt, dabei dürfen die Differenzen zwischen den Einzelmessungen einen bestimmten Betrag nicht überschreiten. Damit wird verhindert, daß einmalig auftretende überhöhte Meßsignale, sog. "Blitze", das Ergebnis verfälschen. Außerdem erfolgt eine automatische Korrektur der durch die Probenverdünnung bedingten Krümmungen der Na^+- und K^+-Kennlinie[40].

Natrium und Kalium

a) Referenzmethode

Flammenphotometrie

Prinzip:
Im wesentlichen besteht das Flammenphotometer aus Vernebler, Brenner und Fotozelle. Die zu analysierende Substanz wird in gelöstem und geeignet verdünntem (hier: 1+50) Zustand mittels Preßluft und passender Düse fein zerstäubt und in die nichtleuchtende Flamme des Brenners gebracht, die von Propan- oder Acetylengas gespeist wird[85].
Leicht verdampfbare Verbindungen färben die Flamme. Durch die thermische Energie werden nämlich die Atome der einzelnen Elemente angeregt und bei der Rückkehr in den Grundzustand strahlt jedes Element Licht einer ganz bestimmten Wellenlänge aus. Je nach Elektrolyt tritt eine charakteristische Färbung auf (Natrium - gelb, Kalium - violett), die umso intensiver ist, je mehr Atome in der Flamme vorhanden sind[40].
Befinden sich mehrere Elektrolyte in der Meßlösung, kann man durch spektrale Zerlegung des emittierten Lichtes, entweder durch Passieren eines Monochromators oder - wie hier - von Interferenzfiltern, die Wellenlänge des interessierenden Elementes isolieren[48].
Die für Natrium (Kalium) typische Meßwellenlänge

von 589 nm (767 nm) wird selektiv ausgefiltert und auf eine Fotozelle gesendet. Diese wandelt das optische Signal in ein elektrisches um, welches nach Verstärkung gemessen wird. Der so bestimmte Wert der Lichtintensität ist der Natrium- (Kalium-) konzentration direkt proportional[85].

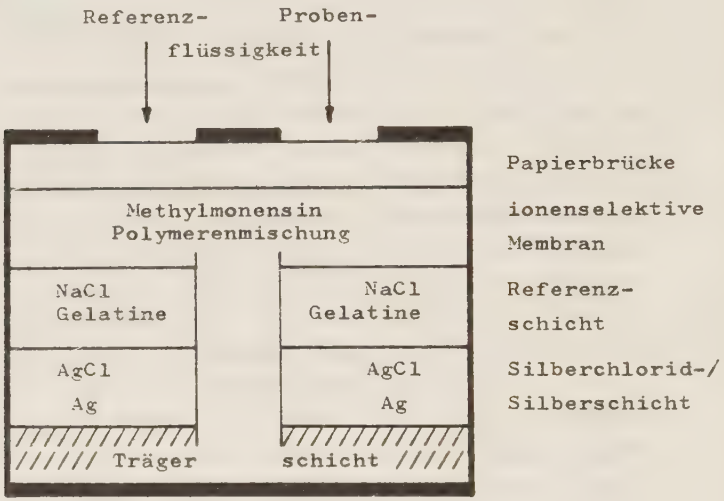
Da bei der Flammenphotometrie nur Relativmessungen möglich sind, wird das Meßsignal einer Probe bekannter Konzentration mit demjenigen der zu bestimmenden Probe verglichen. Daraus errechnet sich dann das endgültige Ergebnis[40].

Meßbedingungen:

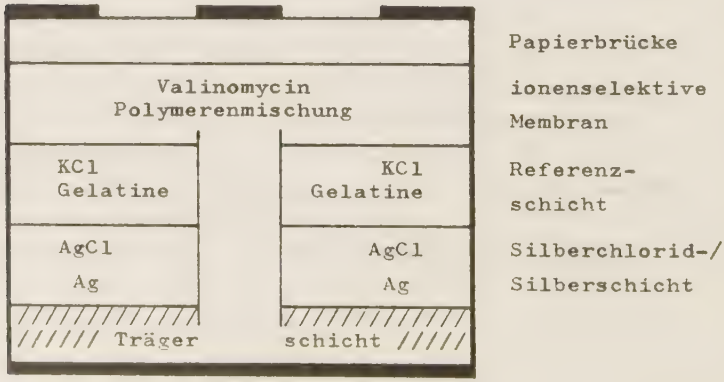
Wellenlänge	Na^+: 589 nm
	K^+: 767 nm
Probenmaterial	Serum
Probenvolumen	40 µl
Verdünnung	1 + 50
Meßvolumen der verdünnten Probe	1000 µl
Meßbereich	Na^+: 60 - 180 mmol/l
	K^+: 1 - 10 mmol/l

b) EKTACHEM-Methode

Querschnitt durch das Na^+-Plättchen:



Querschnitt durch das K^+-Plättchen:



Prinzip:
Die Elektrolytplättchen unterscheiden sich sowohl im Aufbau als auch in der erforderlichen Meßtechnik von den bisher besprochenen EKTACHEM Trockenreagenzträgern. Jedes dieser Elektrolytplättchen enthält ein Paar ionenselektiver Elektroden - eine Proben- und eine Referenzelektrode - mit dem die potentiometrische Messung des Natriums (Kaliums) durchgeführt wird[33,34].
Jede Elektrode besteht - von oben nach unten - aus einer ionenselektiven Membran, einer Referenz-, einer Silberchlorid- und einer Silberschicht[55].
Bei der Herstellung wird das Silber der untersten Schicht auf einen Polyesterträger aufgedampft und anschließend in einem oxydierenden Bad teilweise in Silberchlorid umgewandelt. In diesen beiden Lagen findet der potentialbildende Vorgang statt. Durch die beiden darüberliegenden Schichten wird die Selektivität der Elektroden erreicht[16]. Die ionenselektive Membran kann nur jeweils der zu bestimmende Elektrolyt passieren. Bei der Natriumelektrode besteht sie aus Methylmonensin, bei der Kaliumelektrode aus Valinomycin, jeweils eingebettet in eine Mischung von Polymeren. Die Referenzschicht enthält in einer hydrophilen Gelatinematrix Natrium- bzw. Kaliumchlorid-Kristalle[55].
Auf der Plättchenoberseite verbindet die beiden Halbzellen eine Papierbrücke, in der Proben- und Referenzflüssigkeit innerhalb von ca 20 Sekunden, nachdem sie auf die trockenen Elektroden aufgetropft wurden, zusammenfließen. Bereits nach drei Minuten haben sich stabile Potentiale ausgebildet[16].

Die flüssigkeitsgetränkte Papierbrücke wirkt dabei als Stromschlüssel. Ein Elektrometer mißt die Potentialdifferenz zwischen den beiden Halbzellen, die proportional der Natrium- bzw. Kaliumkonzentration in der getesteten Probe ist[15].

Meßbedingungen:

Meßtemperatur	25 Grad C
Versuchszeit	3 Minuten
Meßbereich	Na^+: 95 - 215 mmol/l
	K^+: 1,0 -11,0 mmol/l
Probenmaterial	Serum, Plasma, Urin (10 µl)

Anmerkung:
Die EKTACHEM - Elektrolytplättchen sind ausschließlich für die Verwendung unverdünnter Proben angelegt. Der Meßbereich ist jeweils ausreichend weit gewählt, so daß seine Über- bzw. Unterschreitung unwahrscheinlich erscheint. Proben für die Natrium- (Kalium-) - Analyse dürfen deshalb nicht verdünnt werden[33,34].
Für die K^+-Analyse sollten keine hämolysierten Proben verwendet werden, da die Kontamination durch Kalium aus den Erythrozyten die Testergebnisse verfälscht[33].
Novros et al. (1984) beschrieben eine Verwendung der Na^+- und K^+- Plättchen für die Bestimmung dieser Elektrolyte im Urin. Hierbei wurden die verwendeten Proben jedoch verdünnt, um die Effekte des Verbindungspotentials, der Ionenstärke und der Störung durch Ammoniumionen auf die ionenselektiven Elektroden zu verringern.

Tab. 2 Testmethoden des KODAK EKTACHEM DT 60 - Analysensystems und Referenzmethoden

Test	Probe	Wellen-länge	Meßbereich	Meßprinzip	Referenzmethode
				Reflometrie (Kinetik)	HITACHI 705
AST	S,P	340 nm	4 - 950 U/l	Abnahme von $NADH_2$	DGKC opt.+
ALT	S,P	340 nm	3 - 950 U/l	Abnahme von $NADH_2$	DGKC opt.
CK	S,P	680 nm	20 - 1800 U/l	Glycerinkinase/Peroxidase	DGKC opt.
ALKP	S,P	400 nm	20 - 1500 U/l	Zunahme von p-Nitrophenol	DGKC opt.
LDH	S,P	340 nm	100 - 1750 U/l	Abnahme von $NADH_2$	DGKC opt.
GGT	S,P	400 nm	5 - 1400 U/l	Zunahme von p-Nitroanilin	Szasz
				Reflometrie (Endpunkt)	
AMYL	S(P)U	555 nm	15 - 900 U/l	gefärbtes Amylopektin	PNP Maltoheptaosid
TBIL	S,P	555 nm	0,1 - 20 mg/dl	Azofarbstoff	DPD (Azofarbstoff)
GLU	SPUC	555 nm	20 -450 mg/dl	Glucoseoxidase/Peroxidase	Hexokinase/G6P-DH
UREA	SPUC	660 nm	10 -214 mg/dl	Urease/Merocyanin	Urease/GLDH
TP	S,P	555 nm	2 - 11 g/dl	Biuret	Biuret
CREA	S,P,U	605 nm	0,1 - 15 mg/dl	Creatinin-iminohydrolase/ Bromphenolblau	PAP
				Potentiometrie	
Na^+	S,P,U		95 -215 mmol/l	Ionenselektive Elektrode	Flammenphotometrie
K^+	S,P,U		1,0 - 11 mmol/l	Ionenselektive Elektrode	Flammenphotometrie

+ optimierte Standardmethode der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie

S: Serum P: Plasma U: Urin C: Liquor cerebrospinalis

1.2.4. Serumverdünnungen

Eine Verdünnung des normalerweise unverdünnt verwendeten Serums machen Analytenkonzentrationen in Patientenproben erforderlich, die oberhalb der Meßbereiche der jeweiligen Parameter liegen. Der DT60 Analyzer zeigt dies auf seinem Anzeigefeld durch den Hinweis "Ergebnis oberhalb Arbeitsbereich" an.
Während der Hersteller eine Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung empfiehlt, mußte ich bei deren Verwendung feststellen, daß die gemessenen Werte, besonders bei Verdünnungsstufen, die grösser als 1:3 waren, z.T. erheblich über den Referenzwerten lagen. Als geeignete Verdünnungsflüssigkeit stellte sich dagegen eine Mischung aus Rinderserumalbumin und physiologischer Kochsalzlösung heraus und zwar, wie Versuche ergaben, in einem Verhältnis von 1+5.
Um Ergebnisverfälschungen so gering wie möglich zu halten, wurde immer nur gerade so viel verdünnt wie nötig war, um einen gültigen Ausdruck des Ergebnisses zu erhalten. Dieses wurde anschließend mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert.
Auch Analytenkonzentrationen, die unterhalb des Arbeitsbereichs des Analyzers liegen, werden angezeigt, können jedoch nicht exakt bestimmt werden.

1.2.5. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der gewonnenen Meßdaten erfolgte mit Hilfe des "STATISTICAL PACKAGE FOR THE SOCIAL SCIENCES" (SPSS[52]; Version 8.3. vom 4. Mai 1982) am Leibniz-Rechenzentrum in München. Dabei wurden u.a. Regressionsanalysen und t-Tests durchgeführt[53,93,95].
Die so erhaltenen Ergebnisse wurden dann auch graphisch dargestellt und zwar in Form von Korrelationsdiagrammen (für jeden untersuchten Parameter/Tierart) und außerdem in Übersichtstabellen zusammengefaßt.

2. ERGEBNISSE

2.1. Qualitätskontrolle

2.1.1. Präzision in der Serie

Die Präzisionsmessungen in der Serie nach der EKTACHEM-Methode wurden mit verschiedenen Einzelseren von Hund, Katze und Pferd durchgeführt; dabei gelangte pro Parameter und Tierart nur eine Konzentration in zehn aufeinanderfolgenden Messungen zur Bestimmung, jedoch wurde bei jeder Tierart möglichst ein anderer Konzentrationsbereich gewählt. Die erzielten Ergebnisse zeigen die Tabellen 3 - 5.
Beim Hund liegen alle Variationskoeffizienten zwischen 0,44 und 3,77 %, also innerhalb des zulässigen Bereichs von bis zu 5 % (Tab.3).
Die Variationskoeffizienten bei der Katze reichen von 0,59 bis 2,88 %, lediglich Gesamtbilirubin mit einem VK von 5,49 % und Creatinin mit 6,24 % liegen knapp oberhalb der für Substrate erlaubten 5 % - Grenze (Tab.4).
Auch beim Pferd sind die Variationskoeffizienten mit Werten zwischen 0,39 und 3,98 % sehr zufriedenstellend (Tab.5).
Bei allen drei Tierarten fällt die sehr gute Repetierbarkeit nahezu aller Enzym-, sowie der Elektrolytbestimmungen auf.

Tab.3 Präzision in der Serie mit Hundeserum (n = 10)

	Mittelwert x	Standard-abweichung s	Variations-koeffizient VK %
ALT U/l	118,50	0,53	0,44
CK U/l	113,90	0,88	0,77
AP U/l	916,30	29,47	3,22
α-Amylase U/l	392,10	11,77	3,00
Gesamtbilirubin mg/dl	4,60	0,08	1,77
Glucose mg/dl	86,10	1,45	1,68
Harnstoff mg/dl	134,20	3,12	2,32
Gesamteiweiß g/dl	6,79	0,15	2,24
Creatinin mg/dl	2,56	0,10	3,77
Natrium mmol/l	148,50	0,85	0,57
Kalium mmol/l	4,55	0,05	1,16

Tab.4 Präzision in der Serie mit Katzenserum (n = 10)

	Mittelwert x	Standard-abweichung s	Variations-koeffizient VK %
ALT U/l	37,50	1,08	2,88
CK U/l	77,40	0,97	1,25
AP U/l	175,50	3,10	1,77
α-Amylase U/l	623,00	15,05	2,42
Gesamtbilirubin mg/dl	0,94	0,05	5,49
Glucose mg/dl	122,40	0,84	0,69
Harnstoff mg/dl	50,40	1,07	2,13
Gesamteiweiß g/dl	6,90	0,18	2,65
Creatinin mg/dl	2,00	0,12	6,24
Natrium mmol/l	155,80	0,92	0,59
Kalium mmol/l	4,64	0,05	1,11

Tab.5 Präzision in der Serie mit Pferdeserum (n = 10)

	Mittelwert x	Standard-abweichung s	Variations-koeffizient VK %
AST U/l	314,80	4,37	1,39
CK U/l	58,10	0,99	1,71
AP U/l	471,70	5,10	1,08
LDH U/l	552,40	6,52	1,18
GGT U/l	19,80	0,79	3,98
Gesamtbilirubin mg/dl	4,36	0,13	2,90
Harnstoff mg/dl	42,30	1,42	3,35
Gesamteiweiß g/dl	6,37	0,16	2,46
Creatinin mg/dl	1,73	0,07	3,90
Natrium mmol/l	136,50	0,53	0,39
Kalium mmol/l	3,77	0,05	1,28

2.1.2. Präzision von Tag zu Tag

Studien zur Präzision von Tag zu Tag erfolgten mit gepoolten Seren. Dazu wurde jeweils ein Serumpool bestehend aus verschiedenen Hunde-, Katzen- bzw. Pferdeseren in zehn Portionen aufgeteilt und bei -18 Grad C tiefgefroren. Einfachbestimmungen je einer dieser Serumportionen fanden an zehn Tagen in einem Zeitraum von ca zwei Monaten statt. Während dieser Zeit wurde keiner der Parameter neu kalibriert, lediglich zu Beginn der Meßserie war das Analysengerät geeicht worden.

Die Resultate der statistischen Auswertung dieser Bestimmungen sind in den Tabellen 6 - 8 zusammengefaßt.
Die Variationskoeffizienten beim Hund liegen mit Ausnahme des Gesamtbilirubins (VK = 51,92 %) und des Creatinins (VK = 9,26 %) unterhalb der zulässigen 5 % - Grenze (Tab.6).
Bei der Katze reichen die Variationskoeffizienten von 0,92 bis 5,22 %, nur Gesamtbilirubin und Creatinin überschreiten mit Werten von 19,50 % und 9,38 % den erlaubten Bereich für Substrate wiederum deutlich (Tab.7).
Beim Pferd mit Variationskoeffizienten von 1,42 bis 8,51 % bestätigt sich diese Tendenz, wenn auch nicht so kraß wie bei Hund und Katze, daß speziell Gesamtbilirubin (VK = 6,00 %) und Creatinin (VK = 8,51 %) mit Abstand die größten Schwankungen aufweisen (Tab.8).

In diesem Zusammenhang ist es aber sicherlich erwähnenswert, daß die untersuchten Konzentrationen des Gesamtbilirubins mit Mittelwerten von 0,13 bzw. 0,51 mg/dl beim Hund bzw. bei der Katze und auch des Creatinins mit Mittelwerten zwischen 1,05 und 1,91 mg/dl bei allen drei Tierarten jeweils an der unteren Grenze des Meßbereichs, jedoch bereits im oberen Normbereich der einzelnen Spezies liegen.

Mit die beste Reproduzierbarkeit zeigen die Elektrolyte mit Variationskoeffizienten des Natriums von 0,92 bis 1,42 % bzw. des Kaliums von 1,36 bis 2,54 %, sowie Glucose (1,10 und 1,39 %) und Gesamteiweiß (1,49 bis 2,65 %).

Tab.6 Präzision von Tag zu Tag mit Hundeserum (n=10)

	Mittelwert x	Standard-abweichung s	Variations-koeffizient VK %
ALT U/l	49,70	1,06	2,13
CK U/l	138,10	4,46	3,23
AP U/l	373,80	16,40	4,39
α-Amylase U/l	814,40	13,75	1,69
Gesamtbilirubin mg/dl	0,13	0,07	51,92
Glucose mg/dl	108,70	2,06	1,89
Harnstoff mg/dl	38,20	1,40	3,66
Gesamteiweiß g/dl	6,62	0,18	2,65
Creatinin mg/dl	1,05	0,10	9,26
Natrium mmol/l	151,00	1,63	1,08
Kalium mmol/l	4,85	0,08	1,75

Tab.7 Präzision von Tag zu Tag mit Katzenserum (n=10)

	Mittelwert x	Standard-abweichung s	Variations-koeffizient VK %
ALT U/l	41,20	1,55	3,76
CK U/l	86,90	1,20	1,38
AP U/l	78,90	4,12	5,22
α- Amylase U/l	866,20	23,47	2,71
Gesamtbilirubin mg/dl	0,51	0,10	19,50
Glucose mg/dl	97,40	1,07	1,10
Harnstoff mg/dl	63,60	2,17	3,41
Gesamteiweiß g/dl	7,59	0,17	2,19
Creatinin mg/dl	1,91	0,18	9,38
Natrium mmol/l	160,20	1,48	0,92
Kalium mmol/l	4,90	0,07	1,36

Tab.8 Präzision von Tag zu Tag mit Pferdeserum (n=10)

	Mittelwert x	Standard-abweichung s	Variations-koeffizient VK %
AST U/l	324,1	8,60	2,65
CK U/l	290,50	8,00	2,76
AP U/l	393,10	25,12	6,39
LDH U/l	566,70	14,55	2,57
GGT U/l	10,50	0,53	5,02
Gesamtbilirubin mg/dl	2,58	0,15	6,00
Harnstoff mg/dl	32,30	0,95	2,94
Gesamteiweiß g/dl	7,13	0,11	1,49
Creatinin mg/dl	1,79	0,15	8,51
Natrium mmol/l	142,10	2,02	1,42
Kalium mmol/l	3,62	0,09	2,54

2.2. Methodenvergleich

Wegen der Vielzahl der untersuchten Parameter und der sich zwangsläufig daraus ergebenden Flut statistischer Kenndaten schien es mir am sinnvollsten und vor allem am anschaulichsten, jeden pro Parameter und Tierart durchgeführten Methodenvergleich in Form einer Graphik darzustellen. Dabei liegen auf der x-Achse die mit der Referenzmethode (Hitachi 705 bzw. Flammenphotometer) und auf der y-Achse die mit der EKTACHEM-Methode ermittelten Werte, die gegeneinander aufgetragen wurden.
Die Abbildungen 6 - 38 zeigen die so entstandenen Kurven mit den nebenstehenden Daten der Regressionsanalyse.
Um bei den meist großen Spannweiten der Meßwerte gerade auch den Normalbereich des jeweiligen Blutparameters deutlicher herauszustellen, wurde von nahezu allen Kurven ein Ausschnitt angefertigt, indem unter Weglassung einiger extrem hoher Werte neue Regressionsgeraden erstellt wurden. Diese Ausschnittskurven mit ihren leicht veränderten Daten sind auf den Abbildungen 6a - 38a zu sehen. Ausnahmen bildeten lediglich die Gesamteiweiß- und die Elektrolytbestimmungen, die keine Extremwerte aufwiesen. Erstere liegen nur als Gesamtkurven vor, letztere wurden zusätzlich in einem anschaulicheren Maßstab erstellt.
In den Tabellen 9 - 11 sind die statistisch ermittelten Werte des Methodenvergleichs für die einzelnen Tierarten in einer Übersicht zusammengefaßt. Aus ihnen kann man neben der Anzahl der

untersuchten Proben, die Spannweiten und Mittelwerte von EKTACHEM- und Referenzmethode entnehmen, ferner die Korrelationskoeffizienten, die Regressionsgeraden und die Standardfehler der Schätzung.

Tab.12 schließlich zeigt die Daten aller Regressionsanalysen im Vergleich bei den drei Tierarten.

2.2.1. Meßdaten beim Hund

Die Ergebnisse des Methodenvergleichs mit Hundeserumproben sind in den Abbildungen 6 - 16a sowie in Tabelle 9 wiedergegeben.
Die Korrelation der EKTACHEM- mit den Referenzmethoden ist für sämtliche Enzyme und Substrate mit Korrelationskoeffizienten (r) zwischen 0,908 und 0,994 als gut bis sehr gut zu bezeichnen. Die Steigungen (b) der Regressionsgeraden bei diesen Parametern weisen - abgesehen von der CK (b = 1,553) - Werte von 0,829 bis 1,209 auf.
Aus Tab.9 ist außerdem zu entnehmen, daß die Achsenabschnitte (a) der y-Achse bei der CK (a = -29,094), der AP (a = 28,161), der α-Amylase (a = -102,452) und dem Harnstoff (a = -14,609) etwas weiter von ihrem Idealwert Null abweichen.
Ziemlich aus dem Rahmen fallen die Elektrolyte. Während das Kalium mit r = 0,361 und der Regressionsgeraden y = 0,900x + 0,637 noch durchaus zufriedenstellende Ergebnisse zeigt, scheint beim Natrium mit r = 0,155 und der Regressionsgeraden y = 0,226x + 112,883 nahezu kein Zusammenhang mehr zwischen den beiden Bestimmungsmethoden zu bestehen.

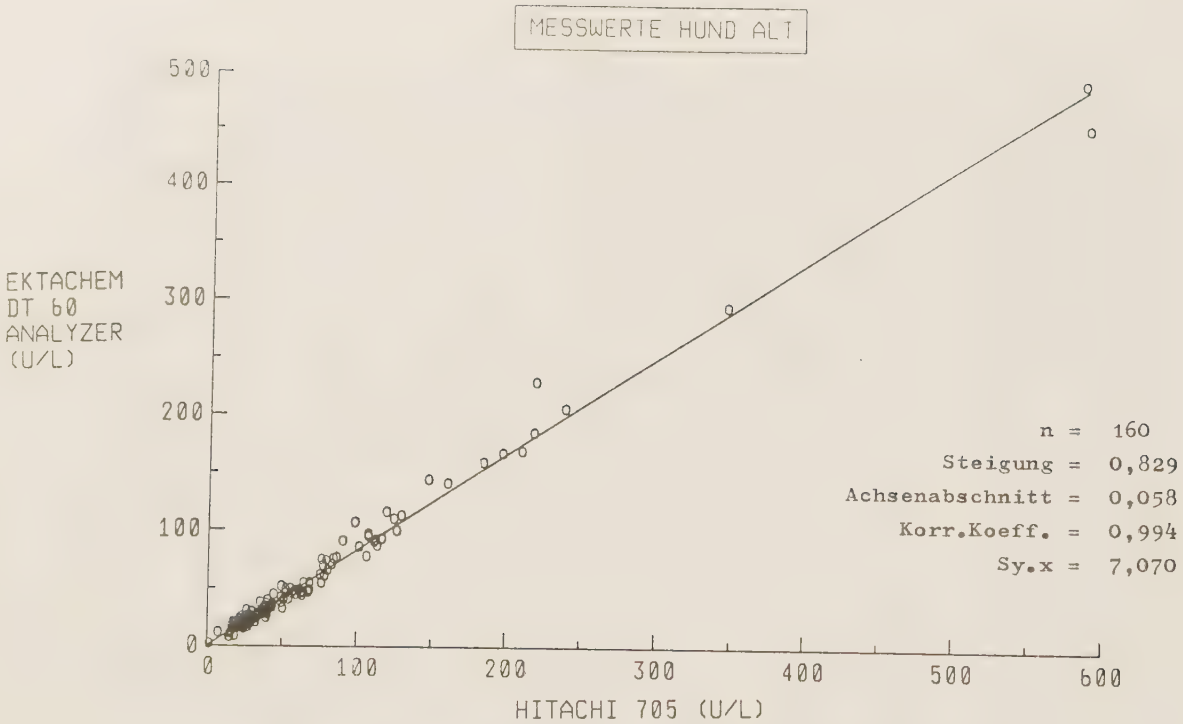


Abb.6 ALT-Bestimmung - Hund. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode

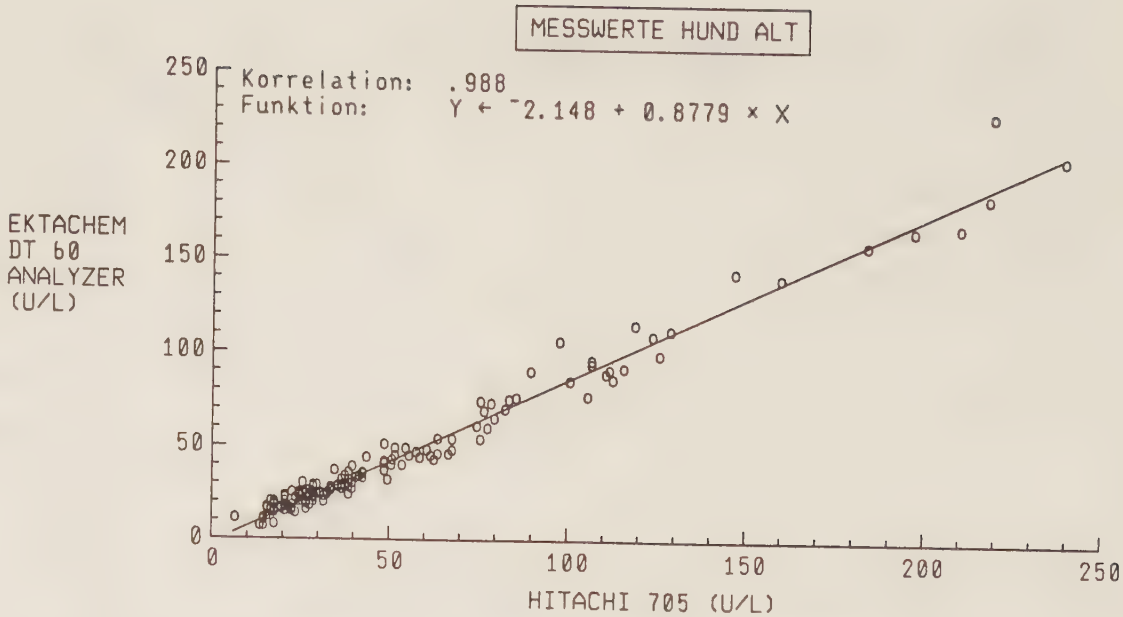


Abb.6a ALT-Bestimmung - Hund. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode (Ausschnitt)

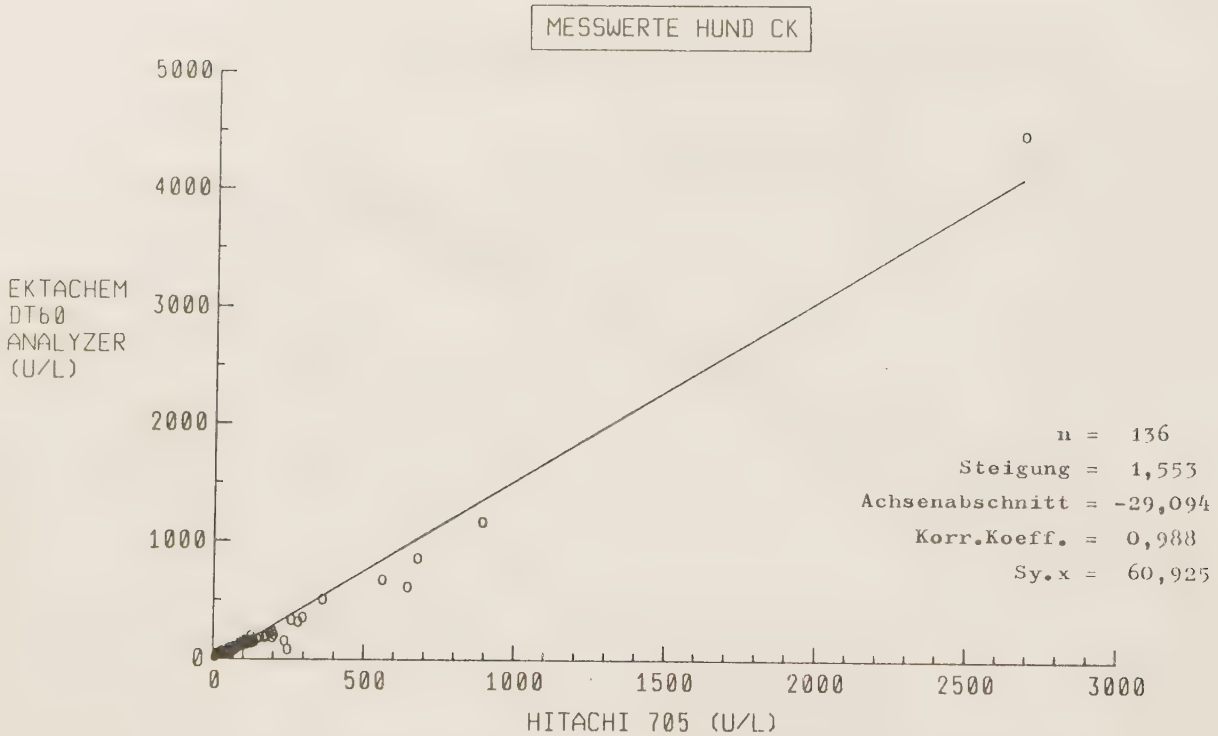


Abb.7 CK-Bestimmung - Hund. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode

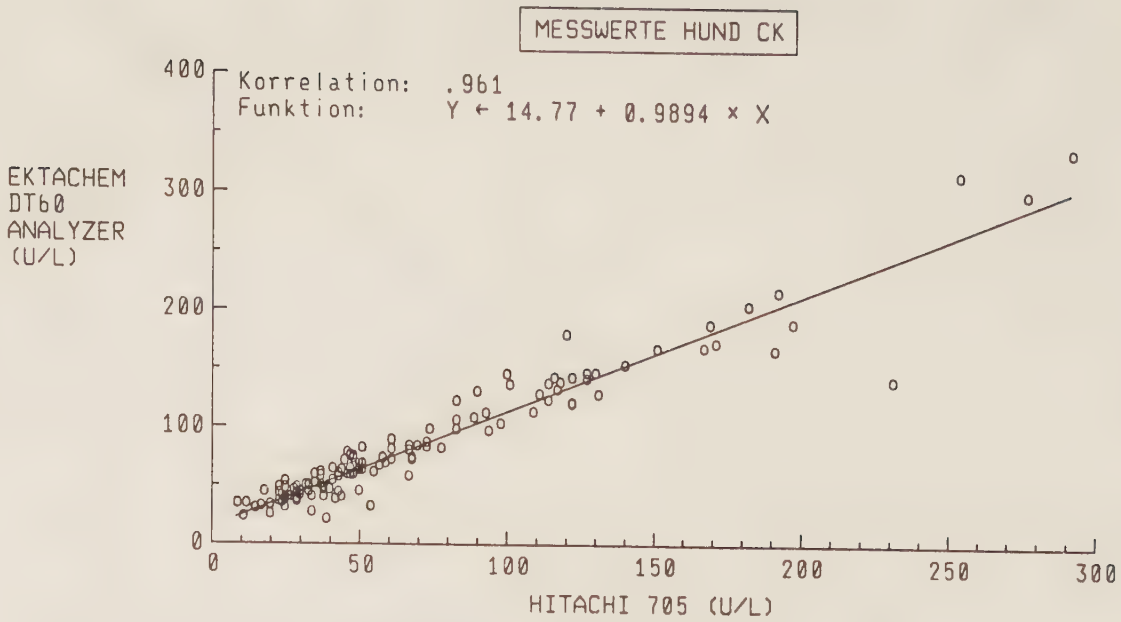


Abb.7a CK-Bestimmung - Hund. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode (Ausschnitt)

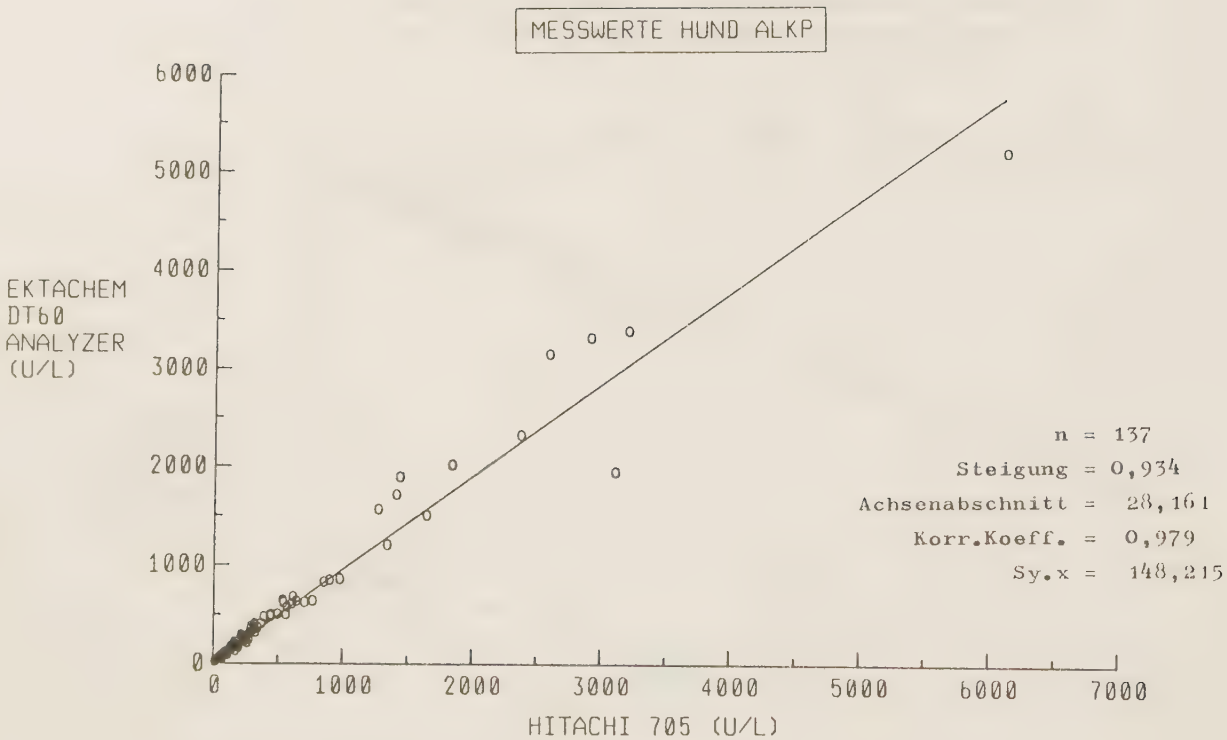


Abb.8 AP-Bestimmung - Hund. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode

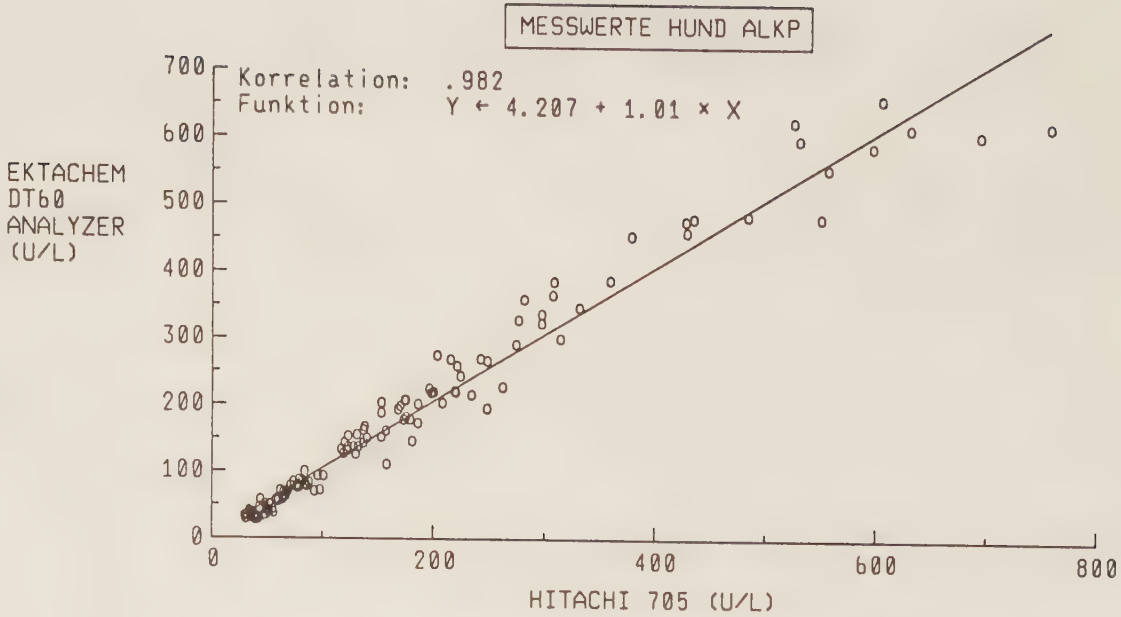


Abb.8a AP-Bestimmung - Hund. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode (Ausschnitt)

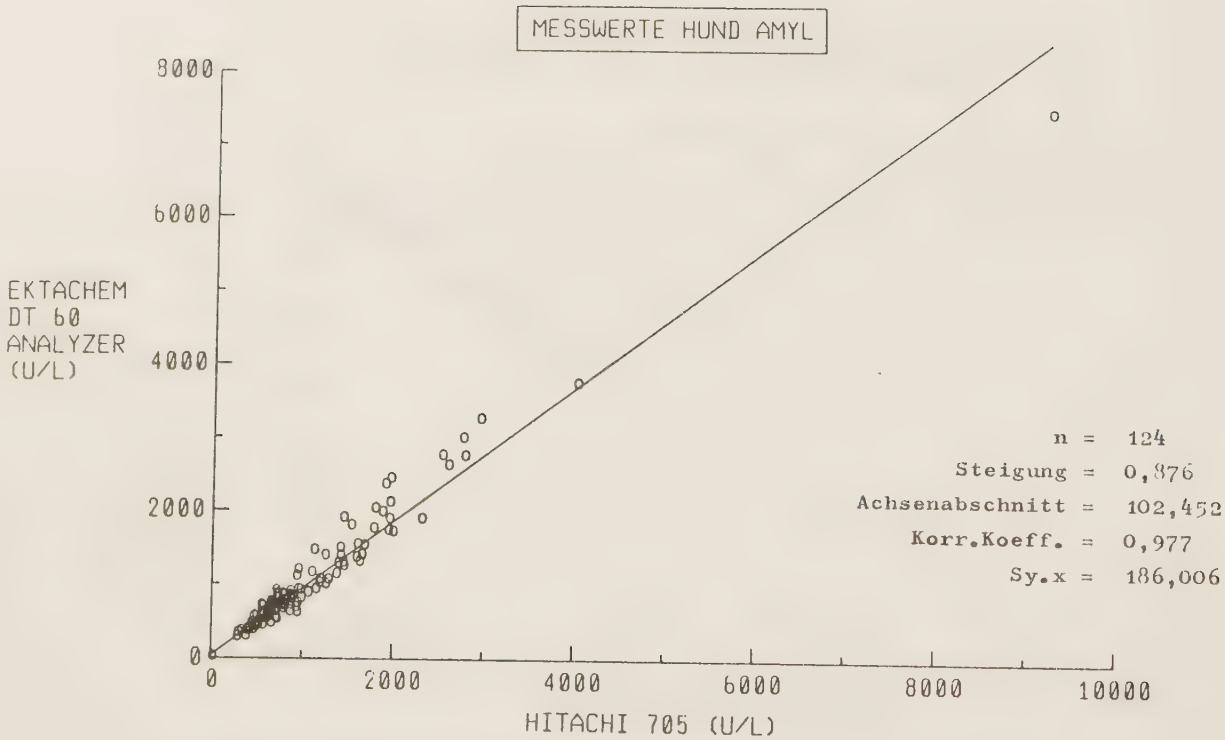


Abb.9 Amylase-Bestimmung - Hund. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode

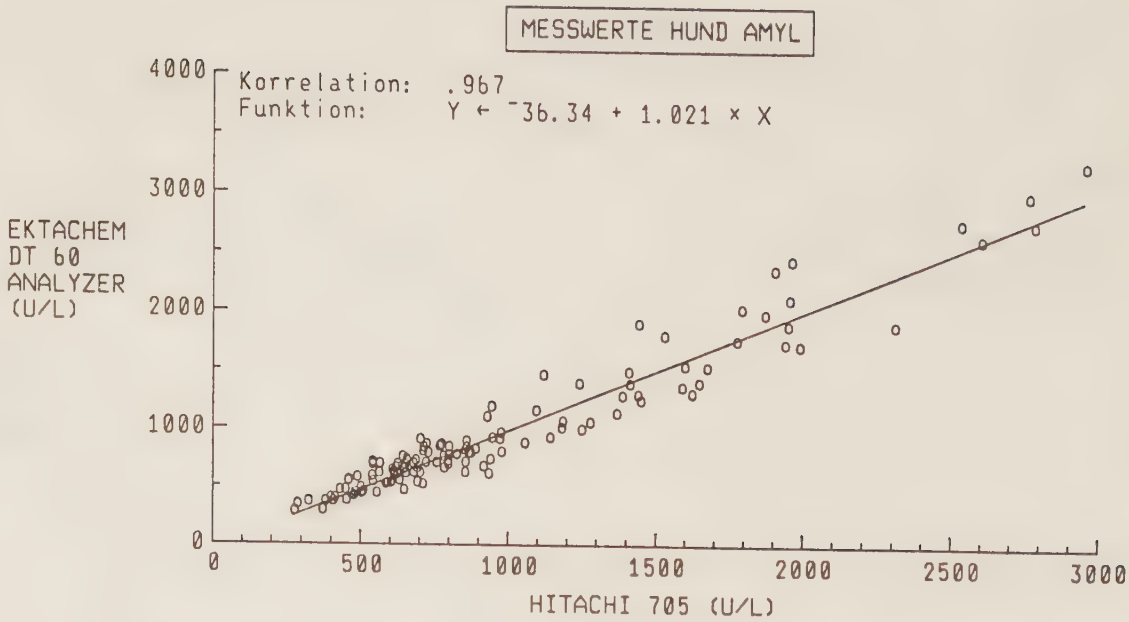


Abb.9a Amylase-Bestimmung - Hund. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode (Ausschnitt)

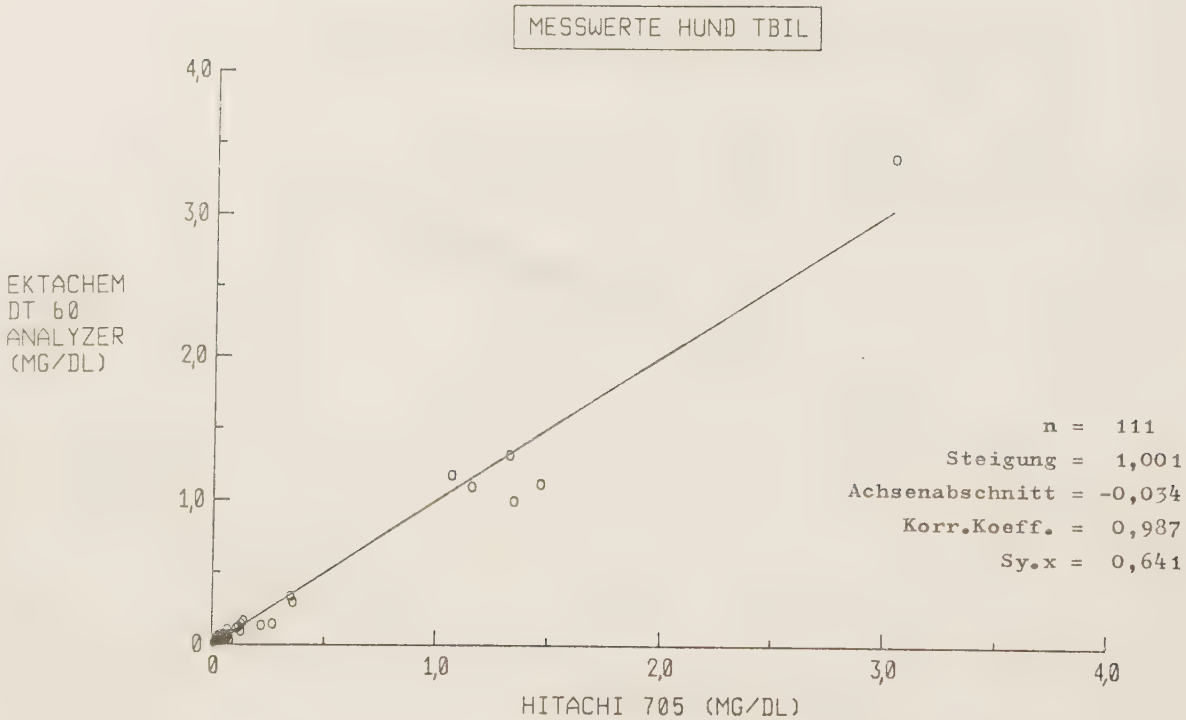


Abb. 10 Gesamtbilirubin-Bestimmung - Hund. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode

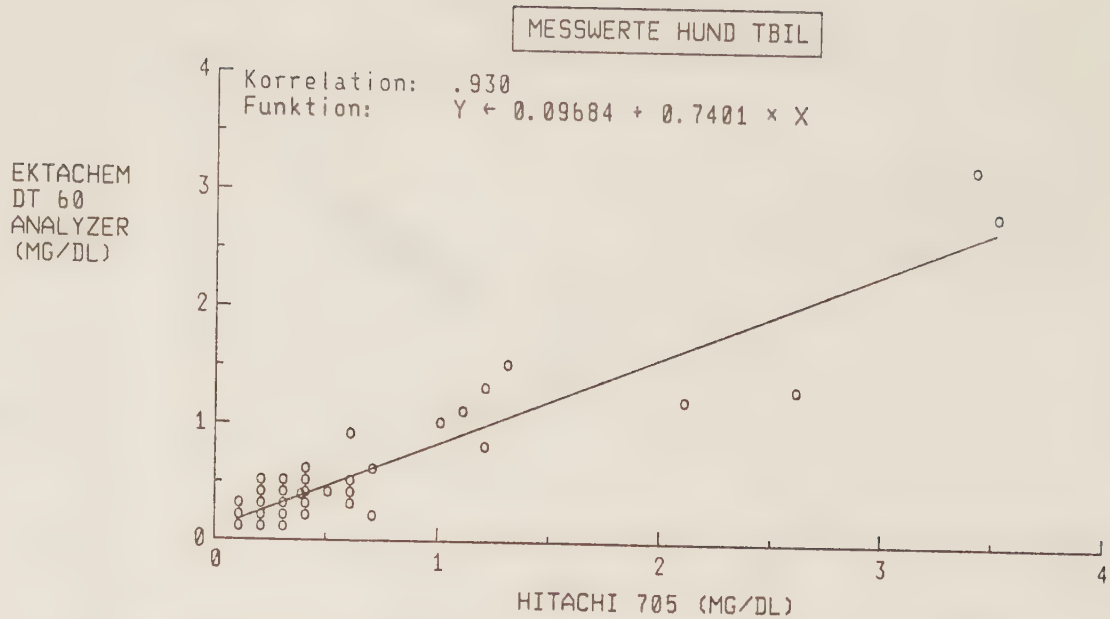


Abb. 10a Gesamtbilirubin-Bestimmung - Hund. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode (Ausschnitt)

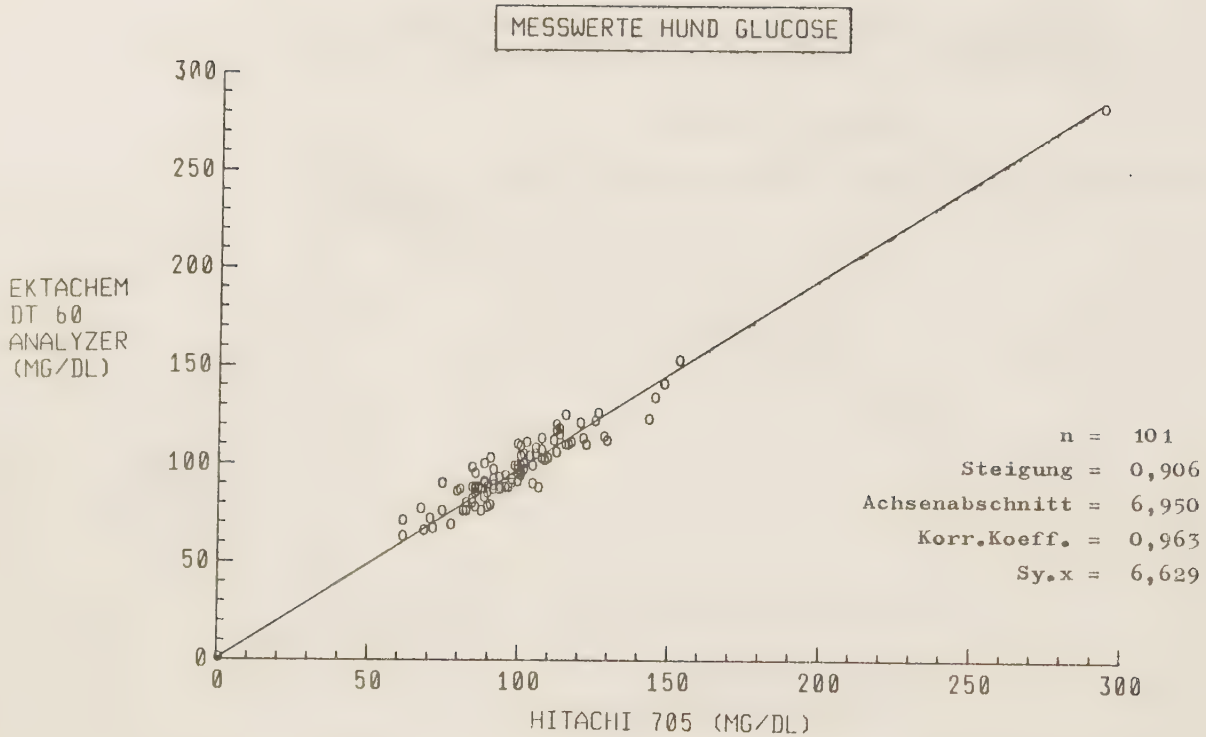


Abb. 11 Glucose-Bestimmung - Hund. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode

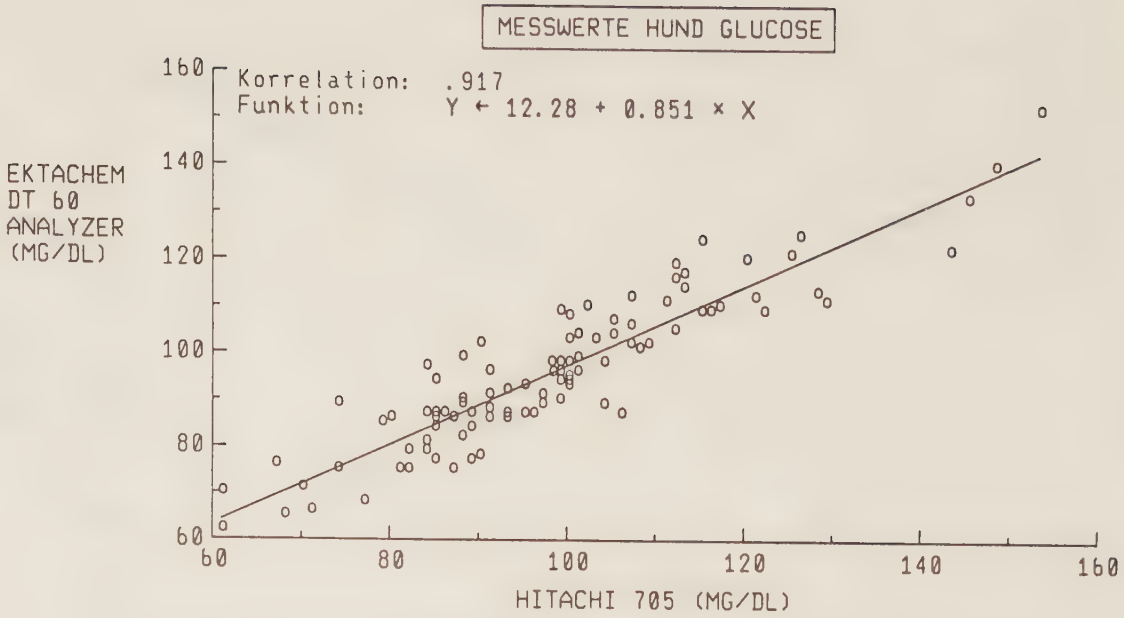


Abb. 11a Glucose-Bestimmung - Hund. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode (Ausschnitt)

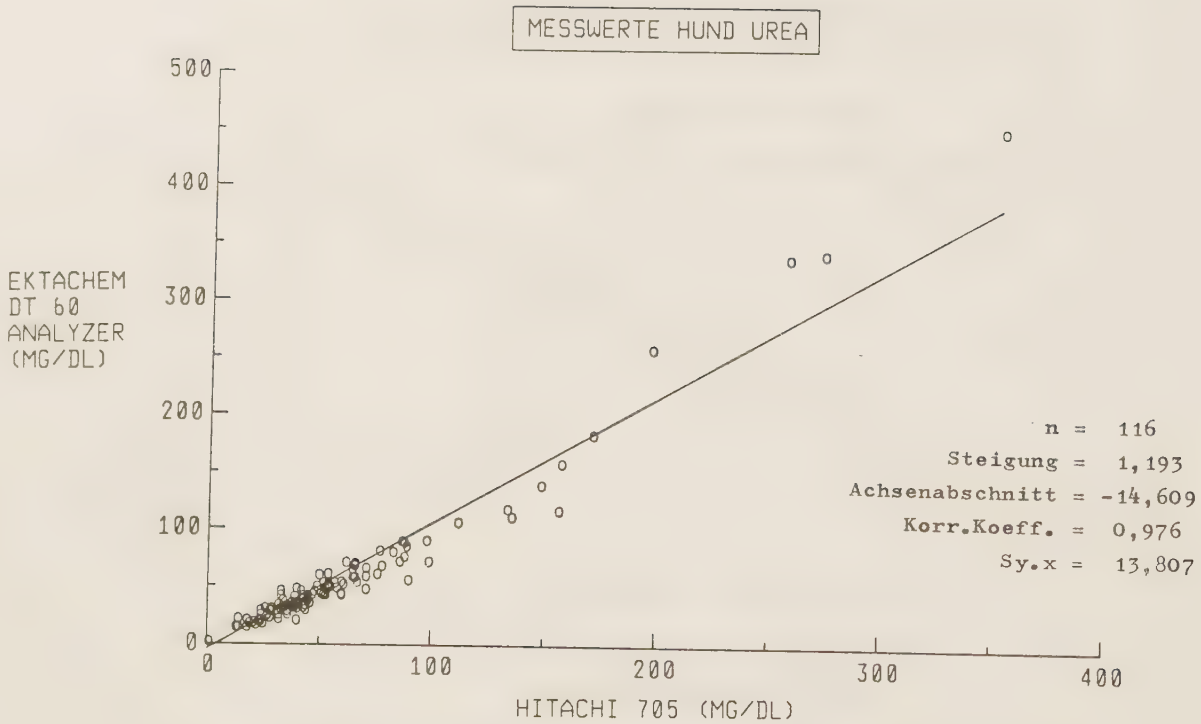


Abb. 12 Harnstoff-Bestimmung - Hund. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode

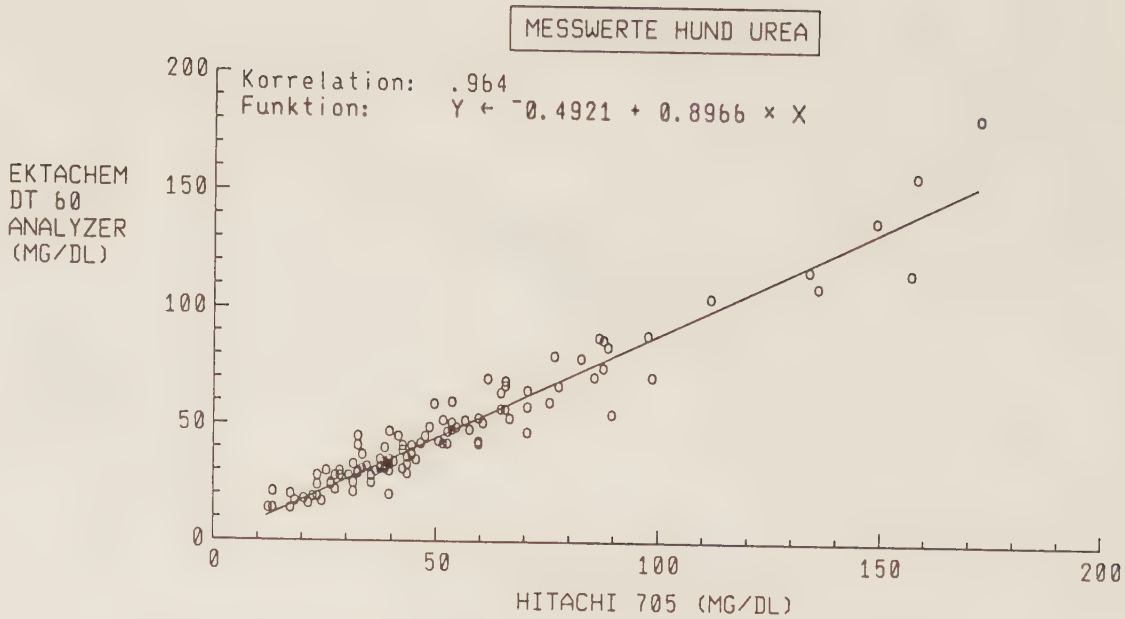


Abb. 12a Harnstoff-Bestimmung - Hund. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode (Ausschnitt)

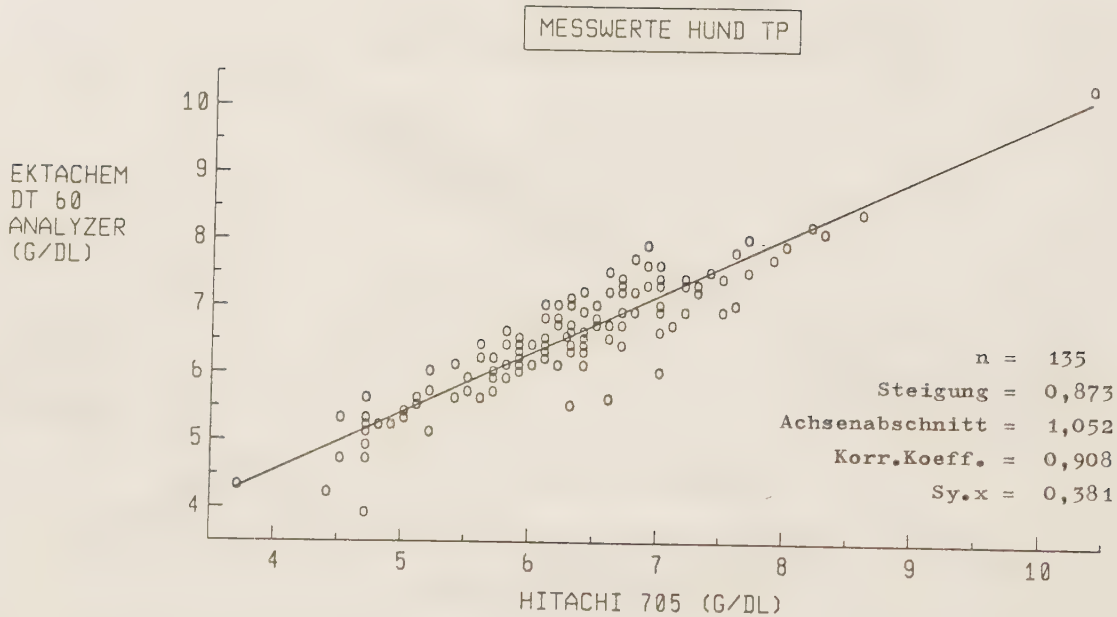


Abb. 13 Gesamteiweiß-Bestimmung - Hund. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode

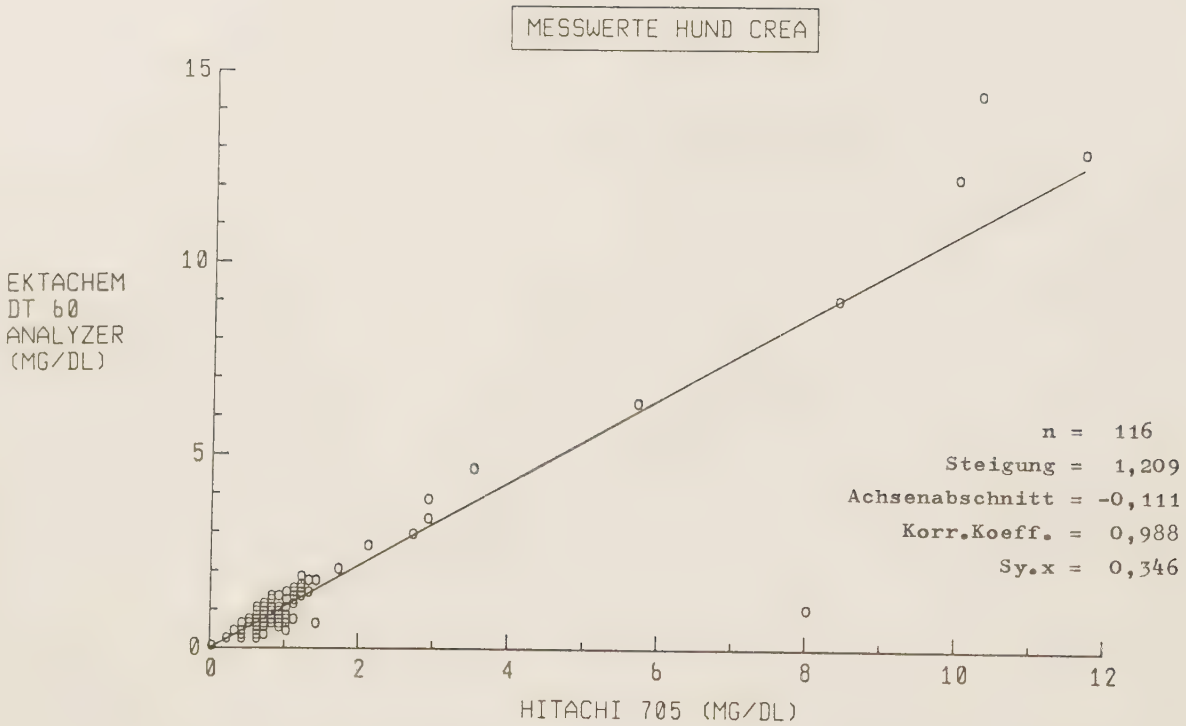


Abb. 14 Creatinin-Bestimmung - Hund. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode

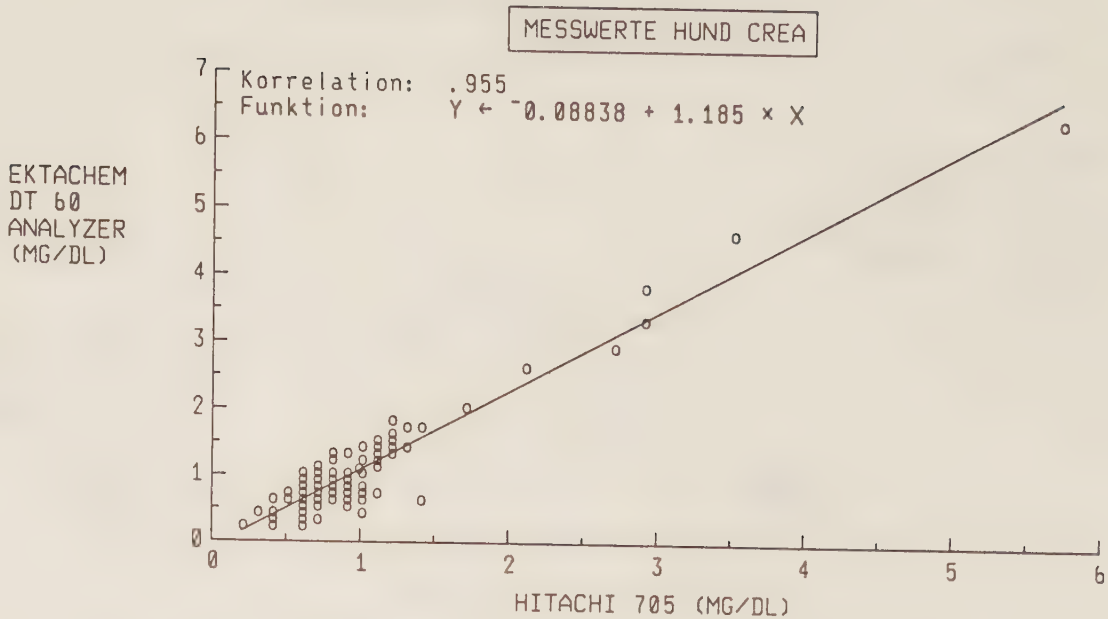


Abb. 14a Creatinin-Bestimmung - Hund. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode (Ausschnitt)

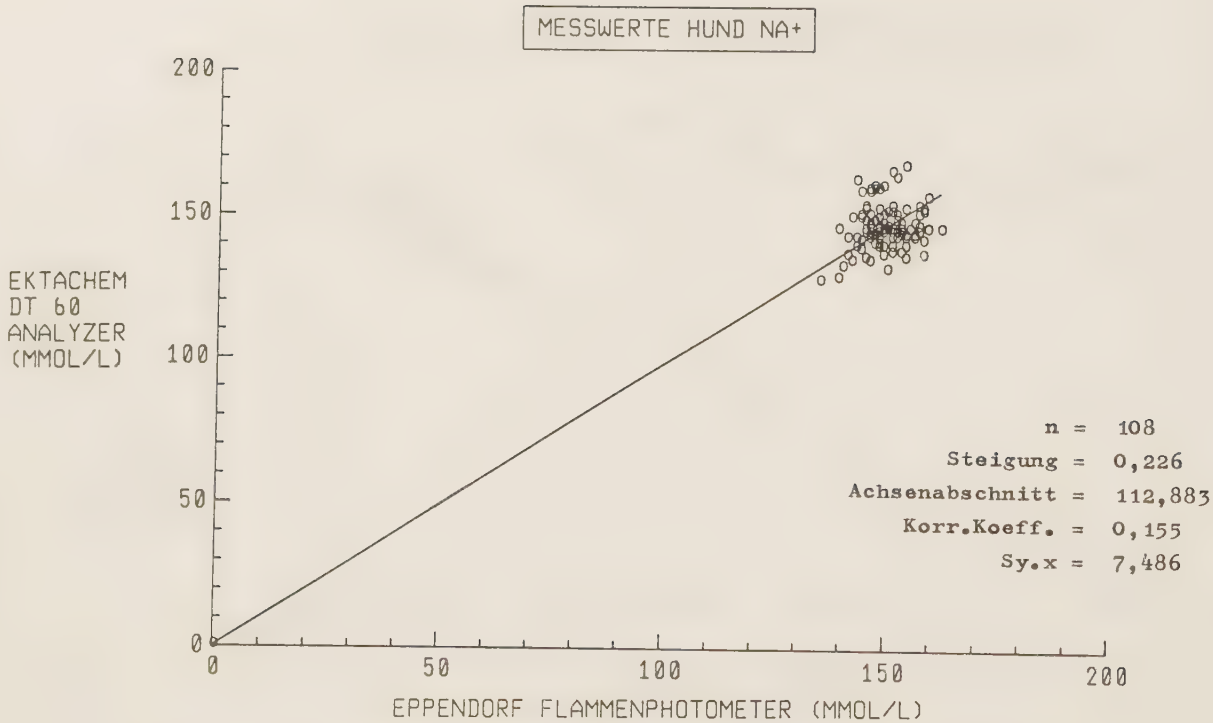


Abb. 15 Natrium-Bestimmung - Hund. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode

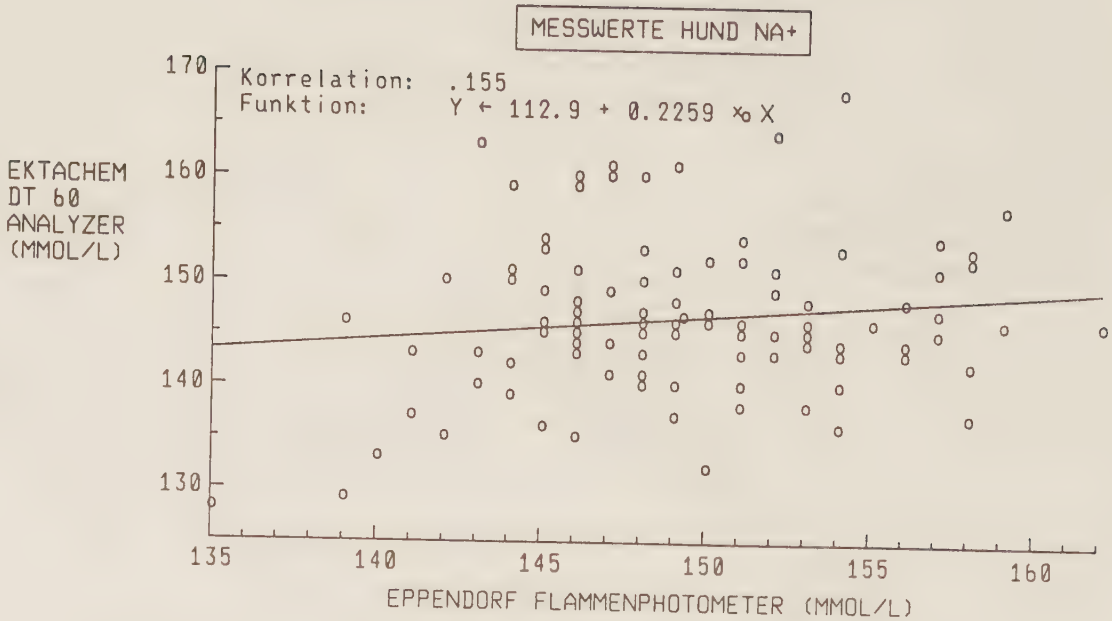


Abb. 15a Natrium-Bestimmung - Hund. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode (Ausschnitt)

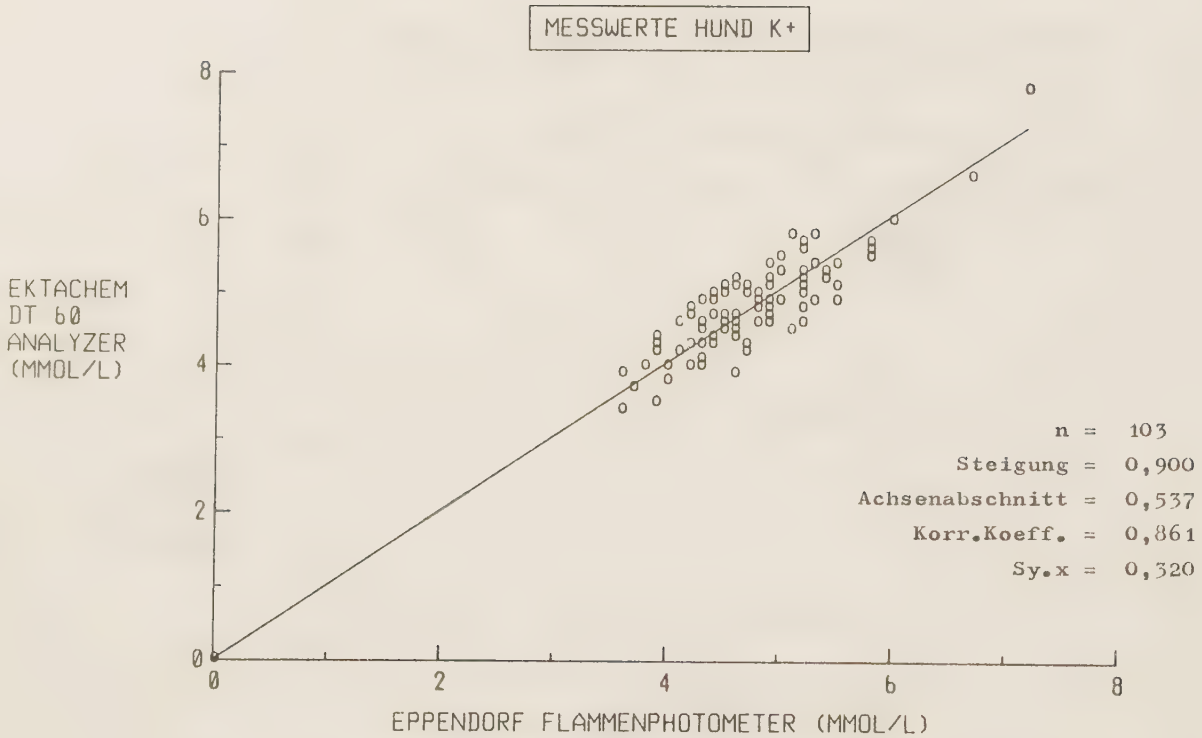


Abb. 16 Kalium-Bestimmung-Hund. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode

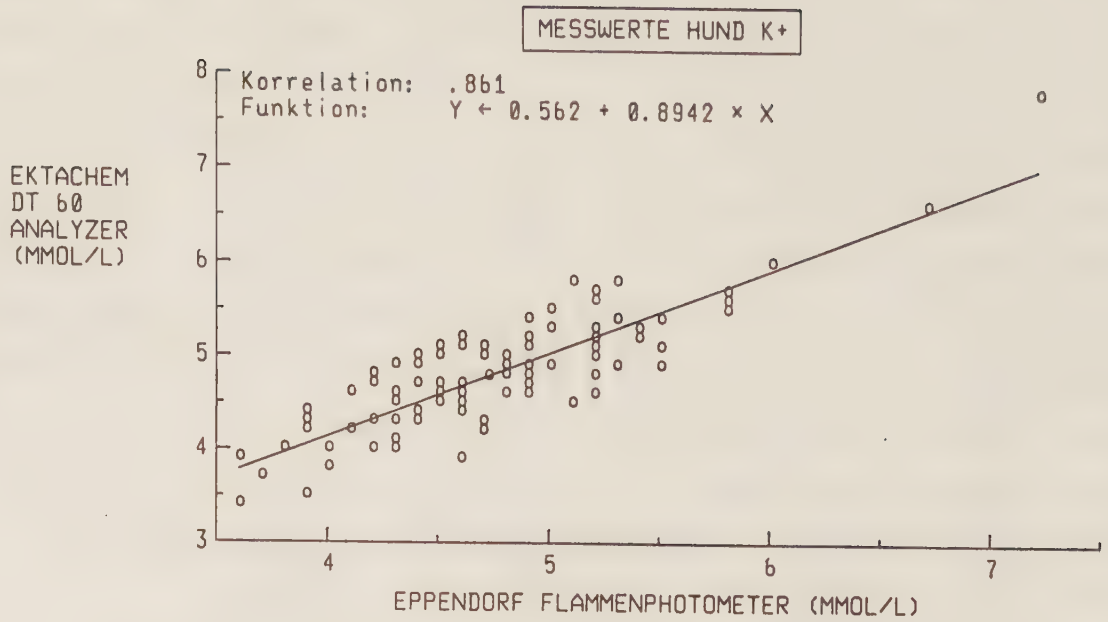


Abb. 16a Kalium-Bestimmung - Hund. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode (Ausschnitt)

Tab.9 Methodenvergleich mit Hundeserumproben:
Daten der Regressionsanalyse und des t - Tests

Test	n	Spannweite Methoden		Mittelwerte Methoden		r	Regressionsgerade y = bx + a		Sy.x
		EKTACHEM	Referenz	EKTACHEM	Referenz		b	a	
ALT	160	6- 492	6- 589	48,86	58,88	0,994	0,829	0,058	7,070
CK	136	20-4456	8-2690	139,29	108,41	0,988	1,553	-29,094	60,925
ALKP	137	25-5196	28-6130	389,07	386,52	0,979	0,934	28,161	148,215
AMYL	124	269-7480	271-9262	1030,06	1059,44	0,977	0,876	102,452	186,006
TBIL	111	0,1-33,9	0,1-30,4	1,17	1,20	0,987	1,001	-0,034	0,641
GLU	101	62- 282	61- 294	97,66	100,10	0,963	0,906	6,950	6,629
UREA	116	13- 450	12- 354	56,49	59,58	0,976	1,193	-14,609	13,807
TP	135	3,9-10,3	3,7-10,4	6,53	6,27	0,908	0,873	1,052	0,381
CREA	116	0,2-14,4	0,2-11,7	1,45	1,29	0,988	1,209	-0,111	0,346
Na^+	108	128- 168	135- 162	146,59	149,24	0,155	0,226	112,883	7,486
K^+	103	3,4- 7,8	3,6- 7,2	4,78	4,72	0,861	0,900	0,537	0,320

2.2.2. Meßdaten bei der Katze

Die Ergebnisse des Methodenvergleichs mit Katzenserumproben sind in den Abbildungen 17 - 27a und in Tabelle 10 dargestellt.
Mit Korrelationskoeffizienten von 0,984 bis 0,998 ist die Korrelation der beiden Methoden zur Bestimmung der Enzymaktivitäten sowie der Gesamtbilirubin-, Glucose- und Creatininkonzentrationen außerordentlich hoch, bei der Harnstoff-, Gesamteiweiß- und Kaliumbestimmung mit r = 0,944, r = 0,896 und r = 946 gut bis sehr gut.
Aus Tab. 10 ist zu entnehmen, daß sowohl die Mittelwerte ($\bar{x}$) aus den CK-Messungen mit 318,24 (EKTACHEM-Methode) bzw. 219,25 U/l (Referenzmethode) als auch die Steigung b = 1,502 bei sehr gutem r von 0,998 auf das Vorliegen eines systematischen Fehlers hindeuten (Vgl. auch CK beim Hund.)
Die Steigungen der restlichen Regressionsgeraden liegen zwischen 0,778 und 1,181. Der Achsenabschnitt fällt nur bei der α-Amylase mit a = -69,939 etwas groß aus.
Die weitaus geringste Korrelation besitzt mit r = 0,224 wiederum das Natrium und dazu eine Regressionsgerade von y = 0,260x + 114,159.

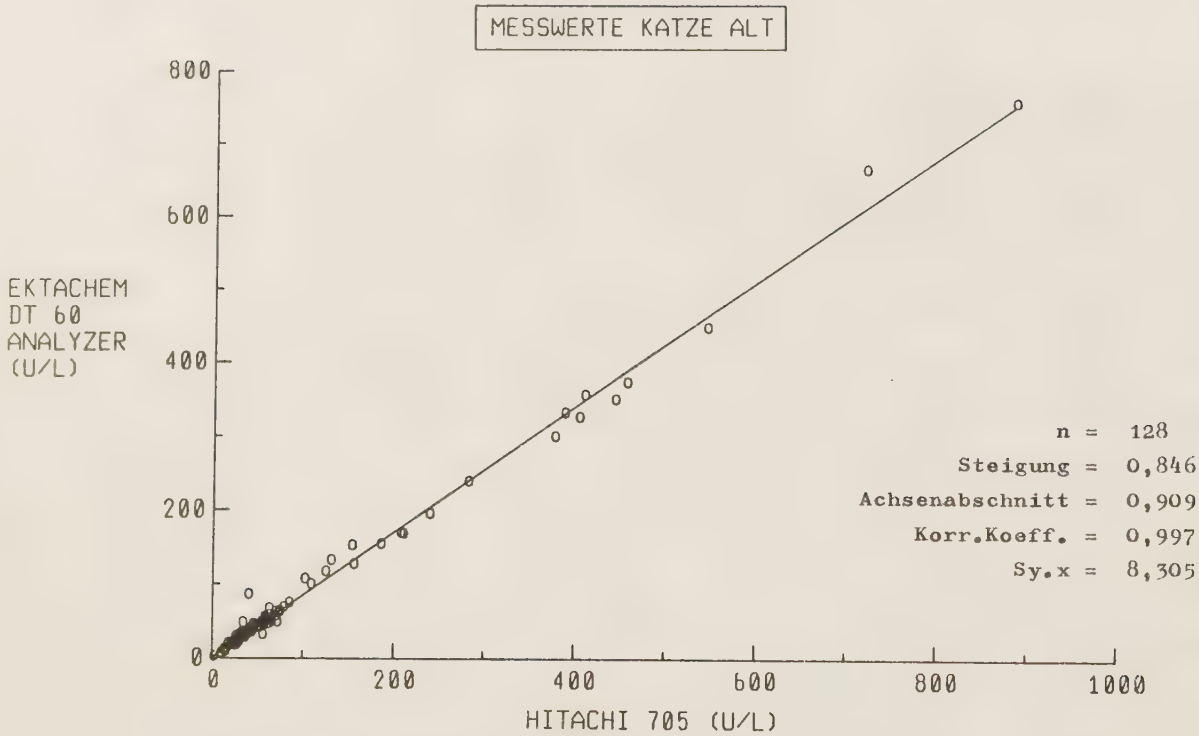


Abb. 17 ALT-Bestimmung - Katze. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode

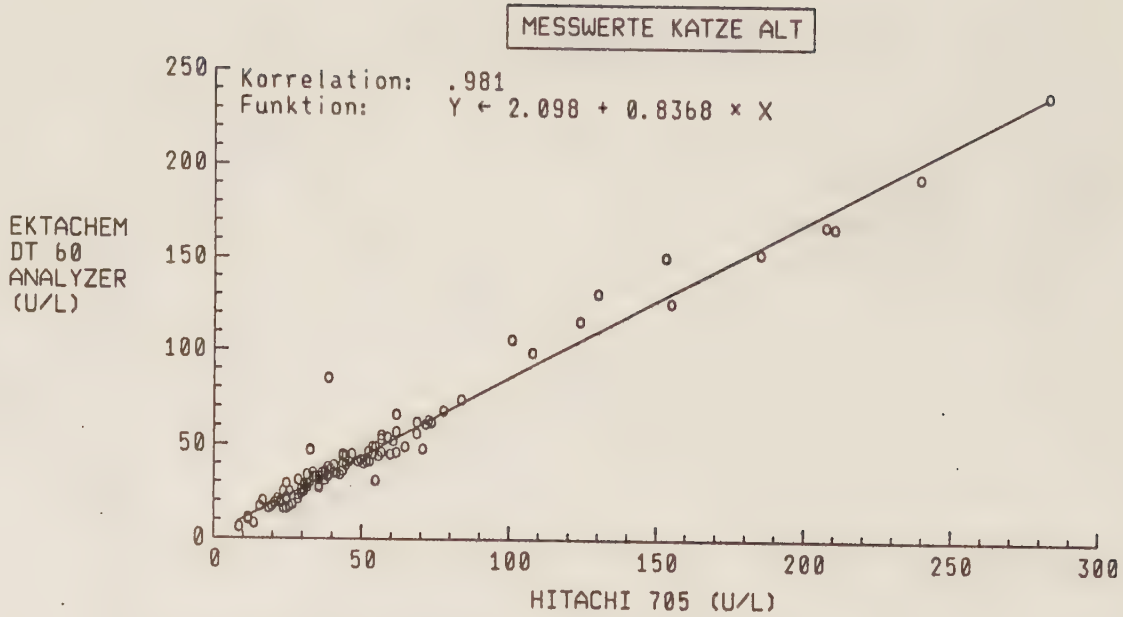


Abb. 17a ALT-Bestimmung - Katze. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode (Ausschnitt)

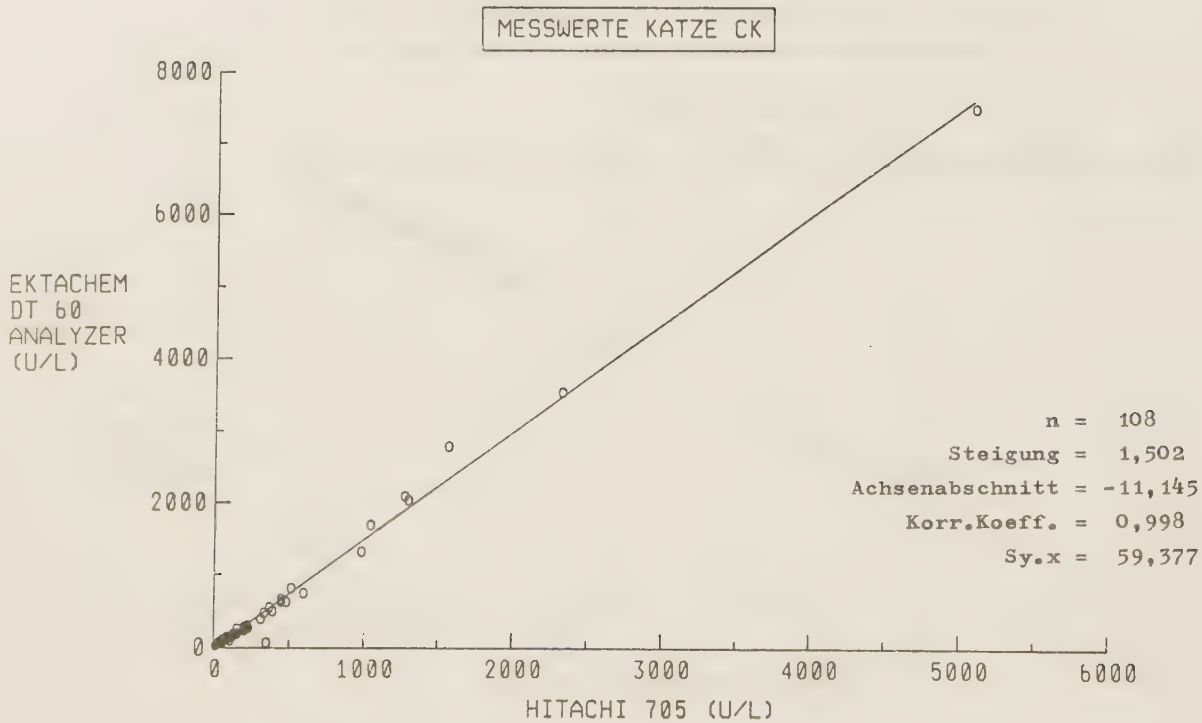


Abb. 18 CK-Bestimmung - Katze. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode

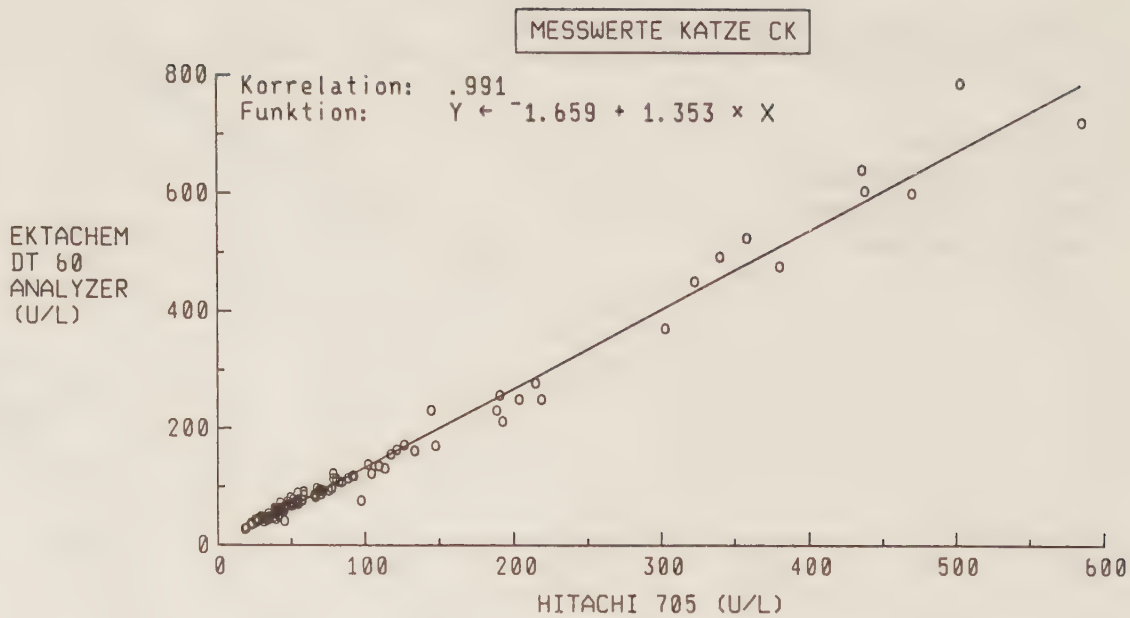


Abb. 18a CK-Bestimmung - Katze. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode (Ausschnitt)

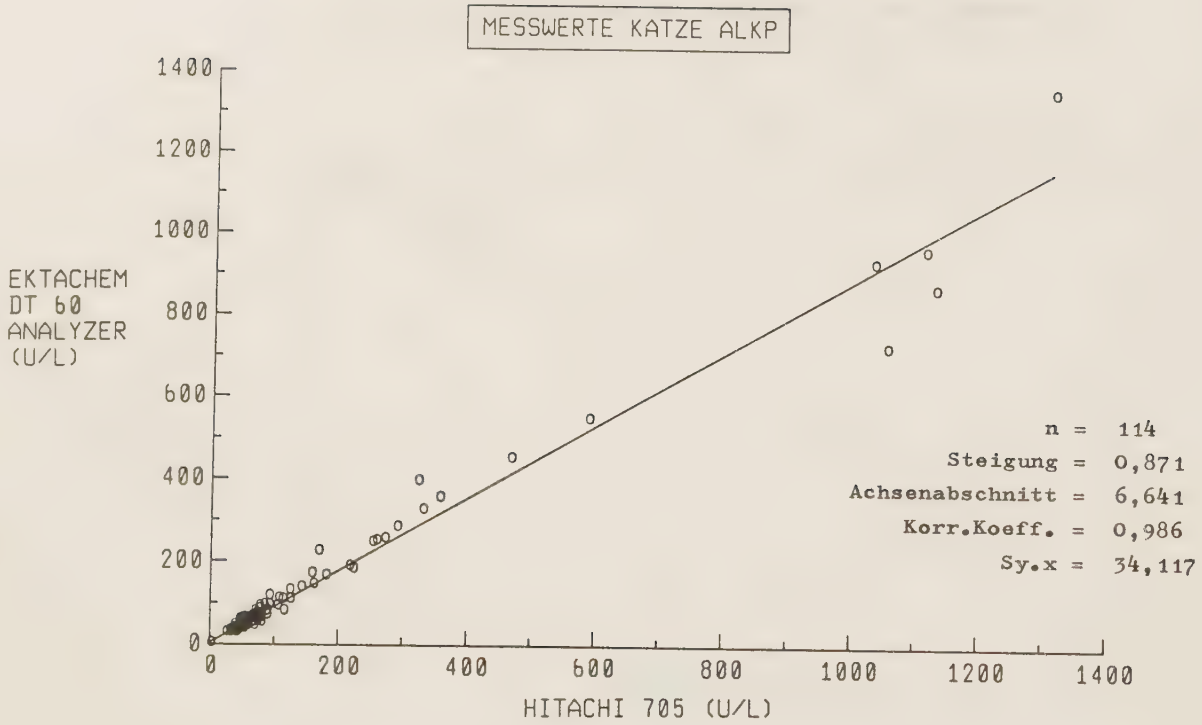


Abb. 19 AP-Bestimmung - Katze. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode

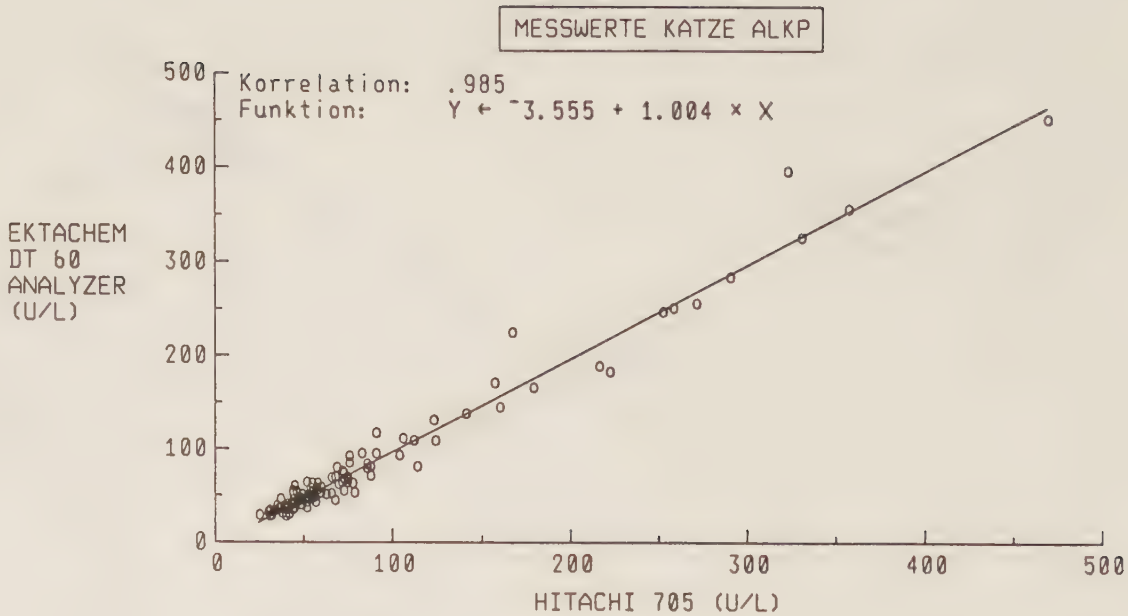


Abb. 19a AP-Bestimmung - Katze. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode (Ausschnitt)

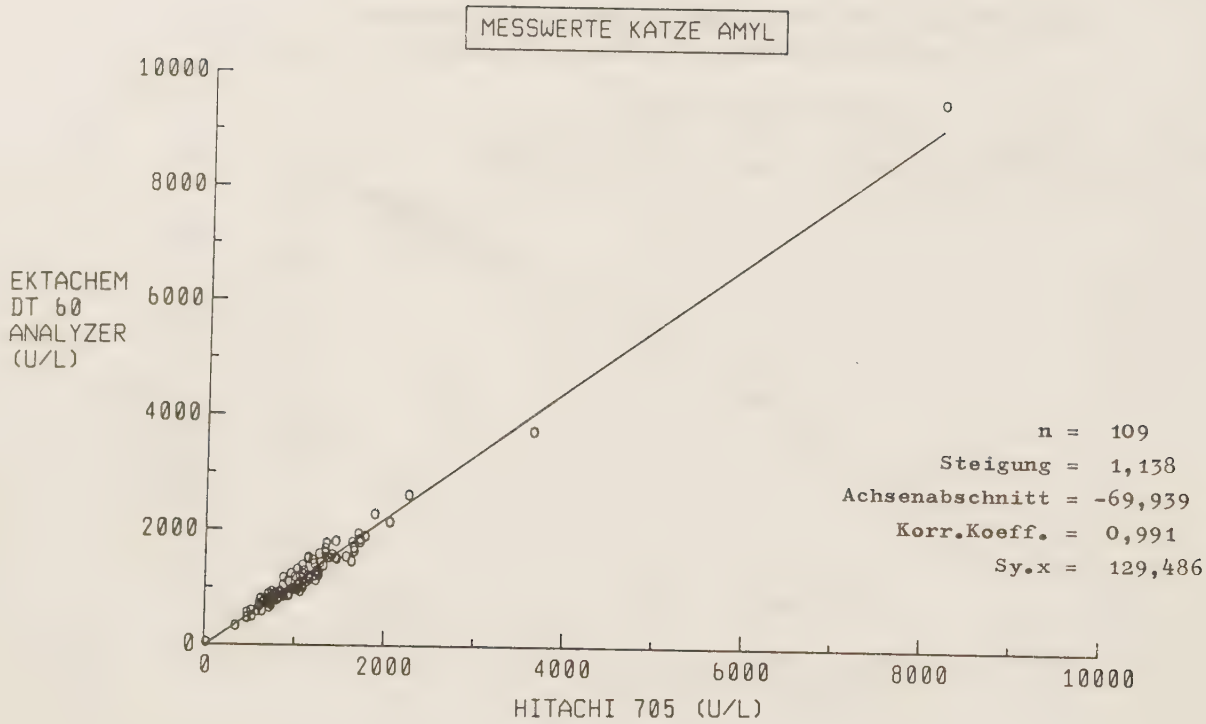


Abb.20 Amylase-Bestimmung - Katze. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode

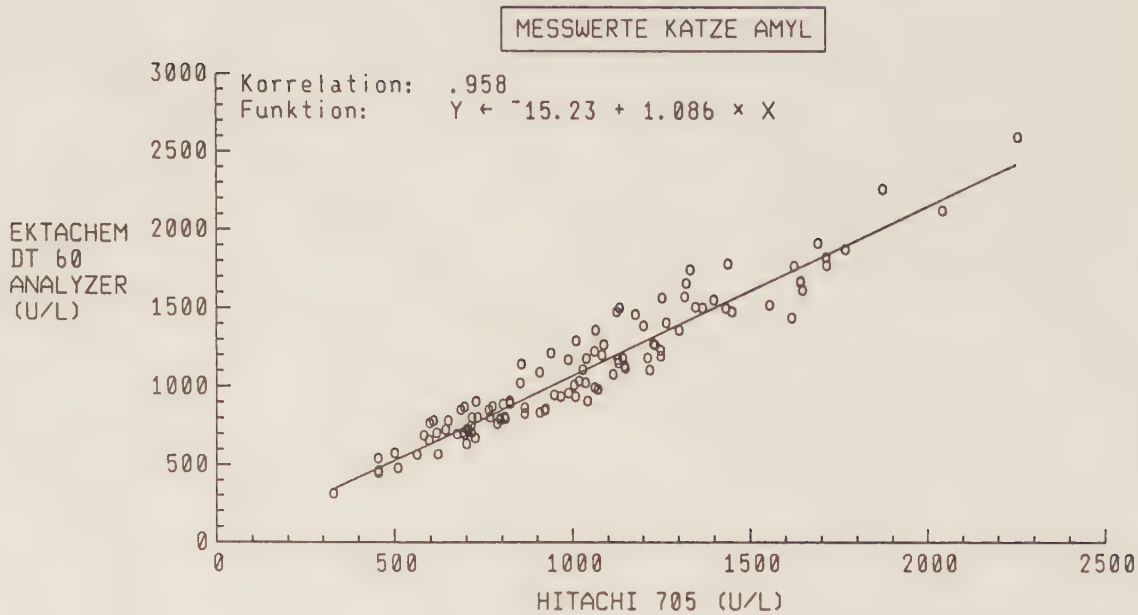


Abb.20a Amylase-Bestimmung - Katze. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode (Ausschnitt)

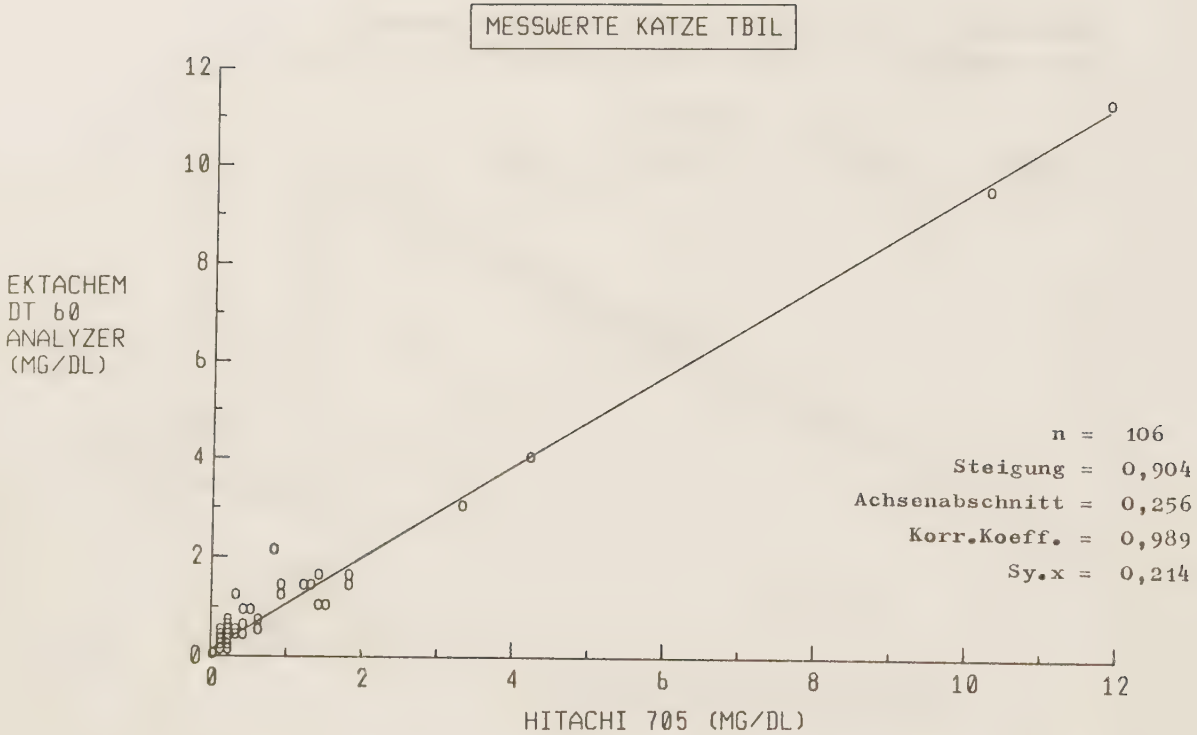


Abb.21 Gesamtbilirubin-Bestimmung - Katze. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode

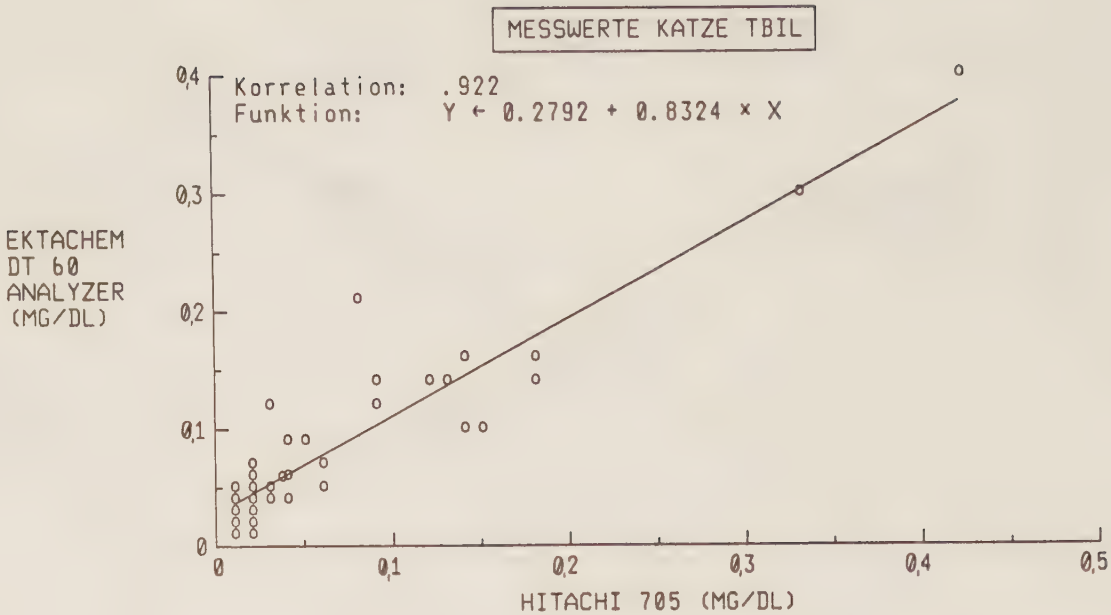


Abb.21a Gesamtbilirubin-Bestimmung - Katze. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode (Ausschnitt)

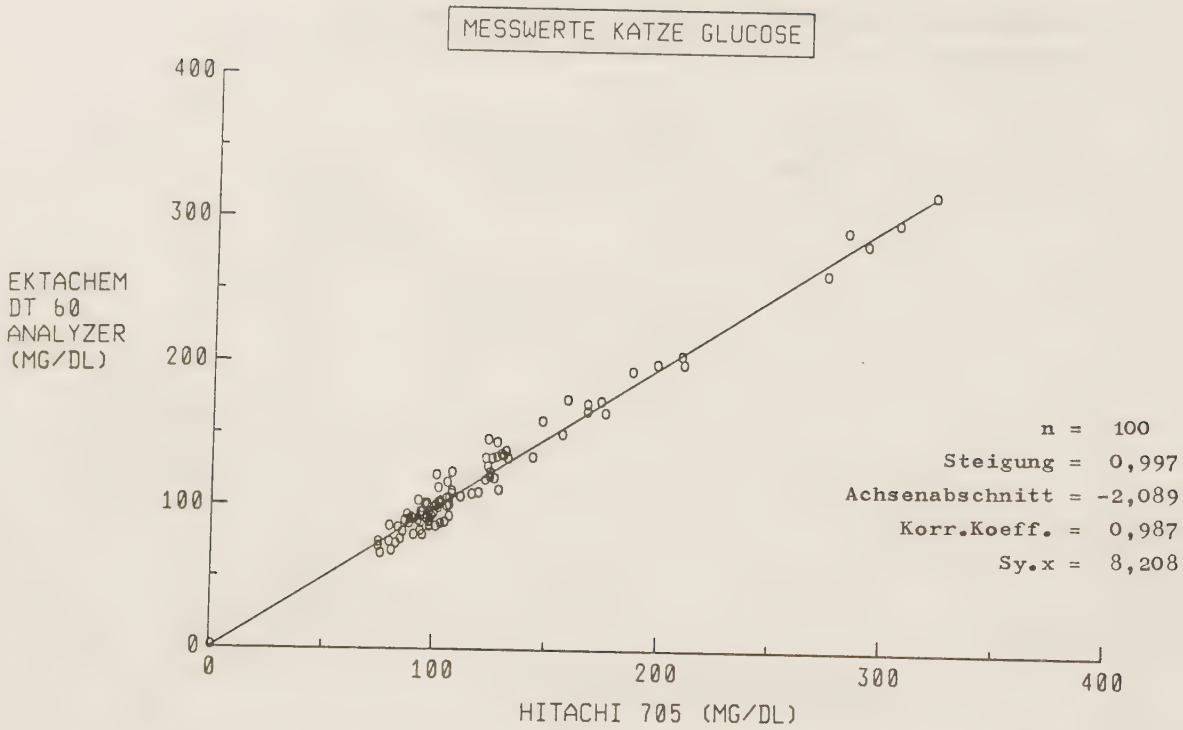


Abb.22 Glucose-Bestimmung - Katze. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode

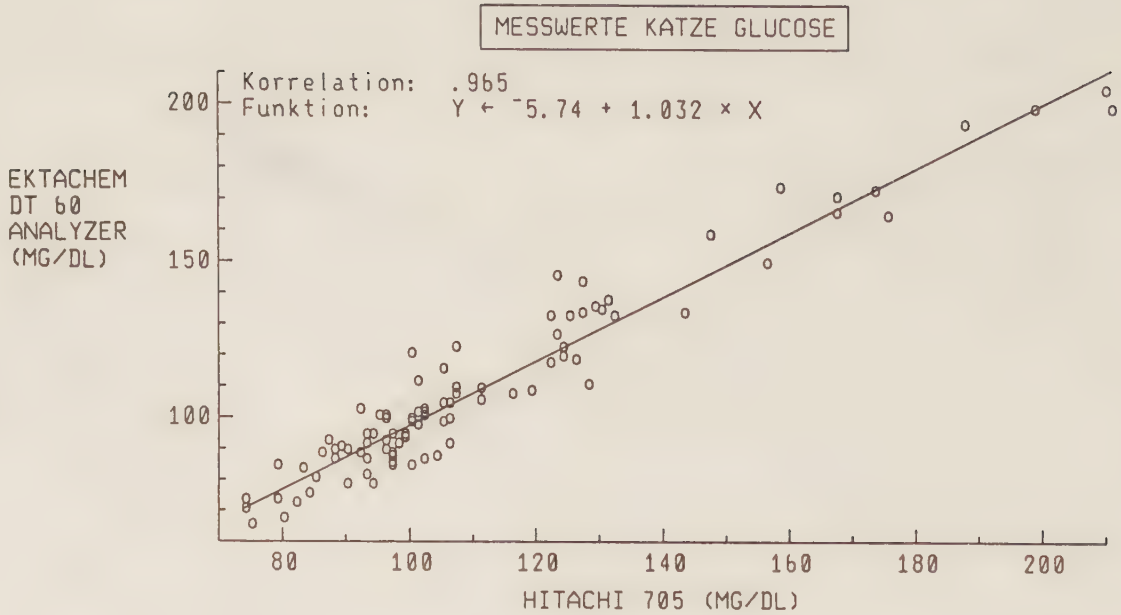


Abb.22a Glucose-Bestimmung - Katze. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode (Ausschnitt)

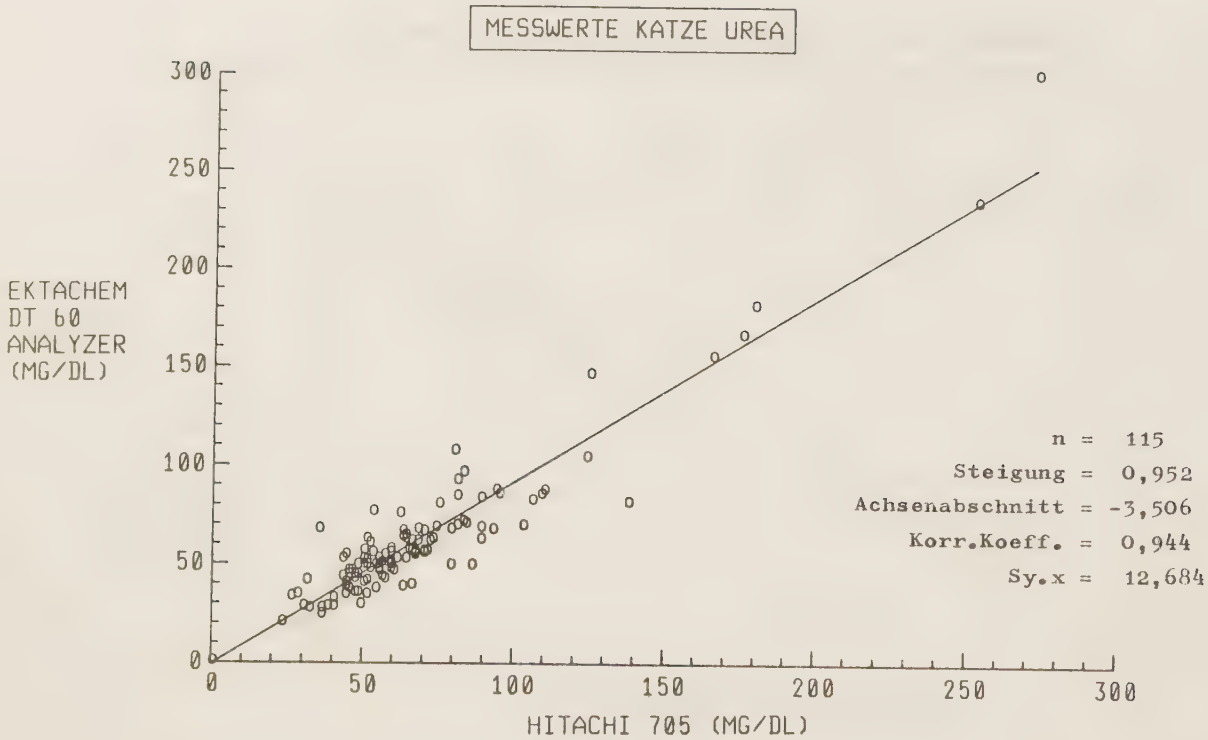


Abb.23 Harnstoff-Bestimmung - Katze. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode

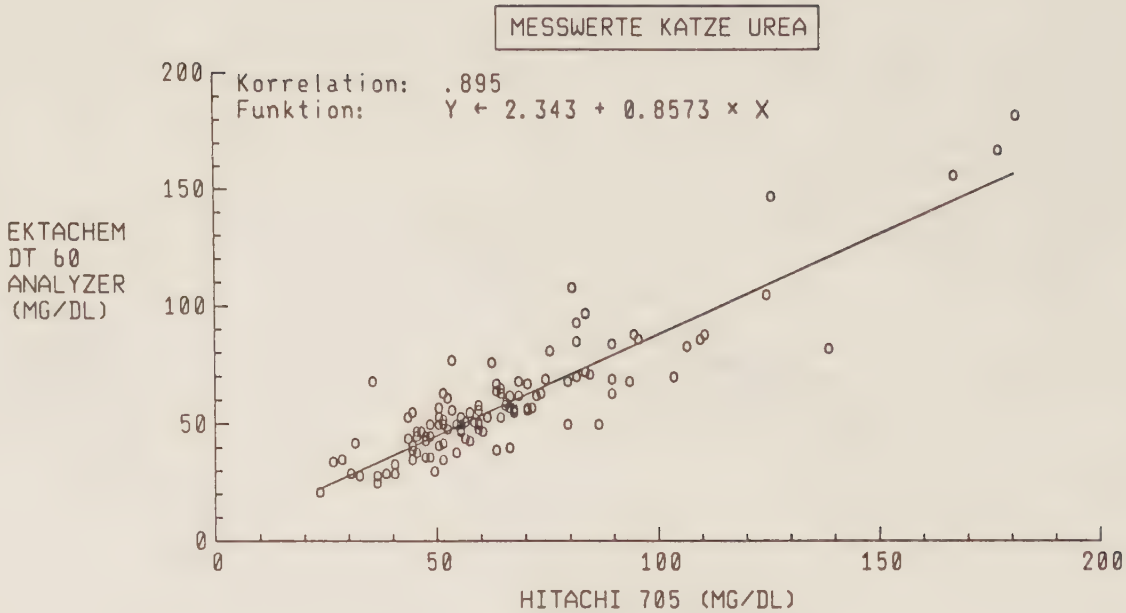


Abb.23a Harnstoff-Bestimmung - Katze. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode (Ausschnitt)

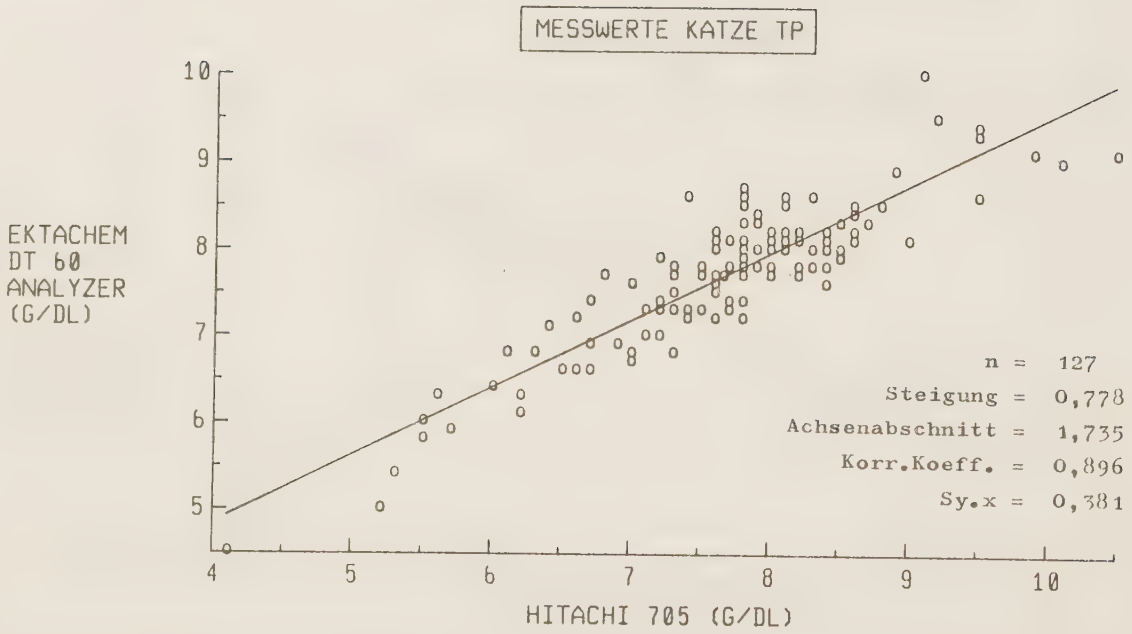


Abb.24 Gesamteiweiß-Bestimmung - Katze. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode

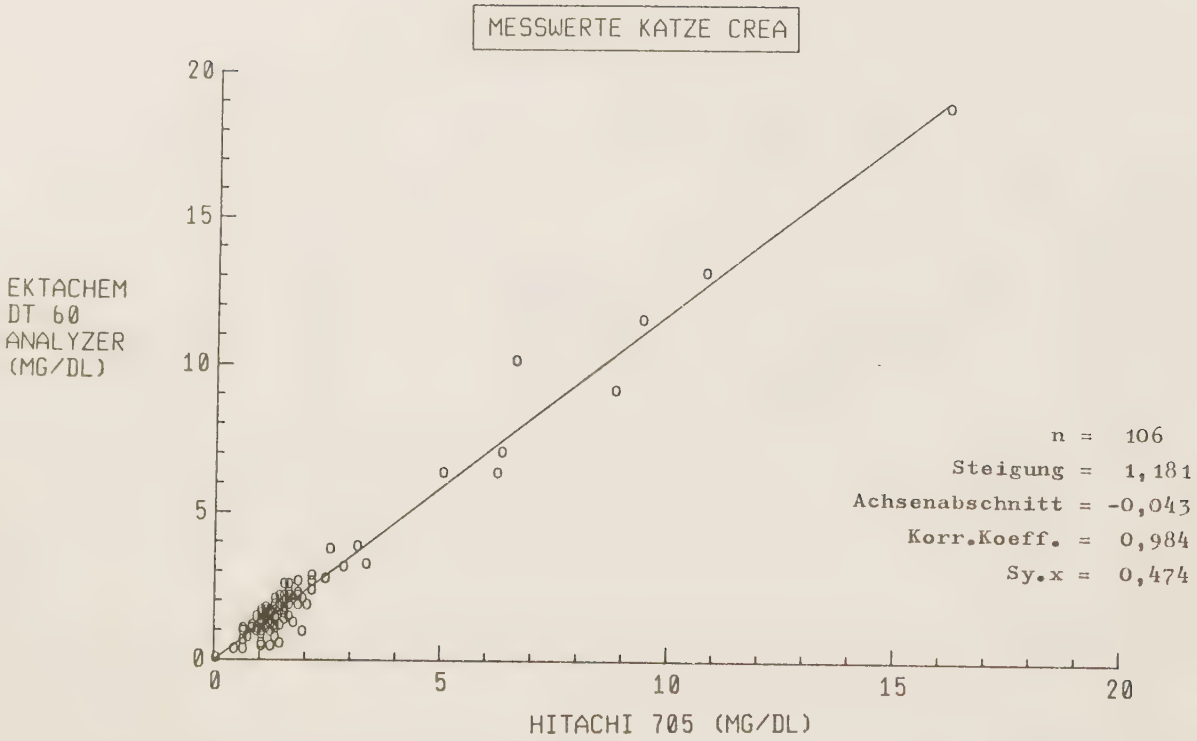


Abb.25 Creatinin-Bestimmung - Katze. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode

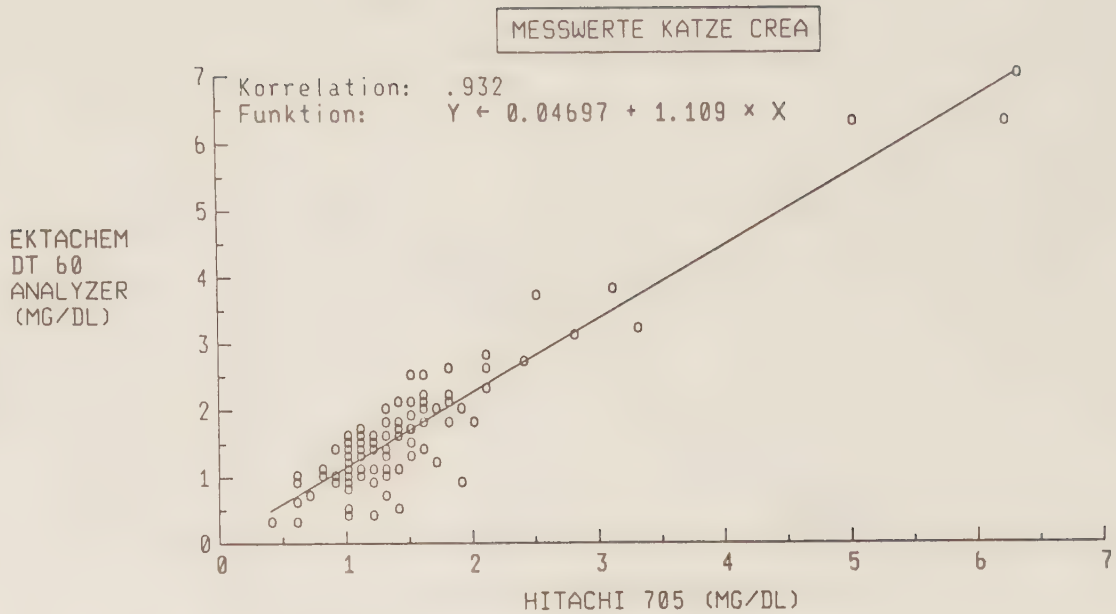


Abb.25a Creatinin-Bestimmung - Katze. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode (Ausschnitt)

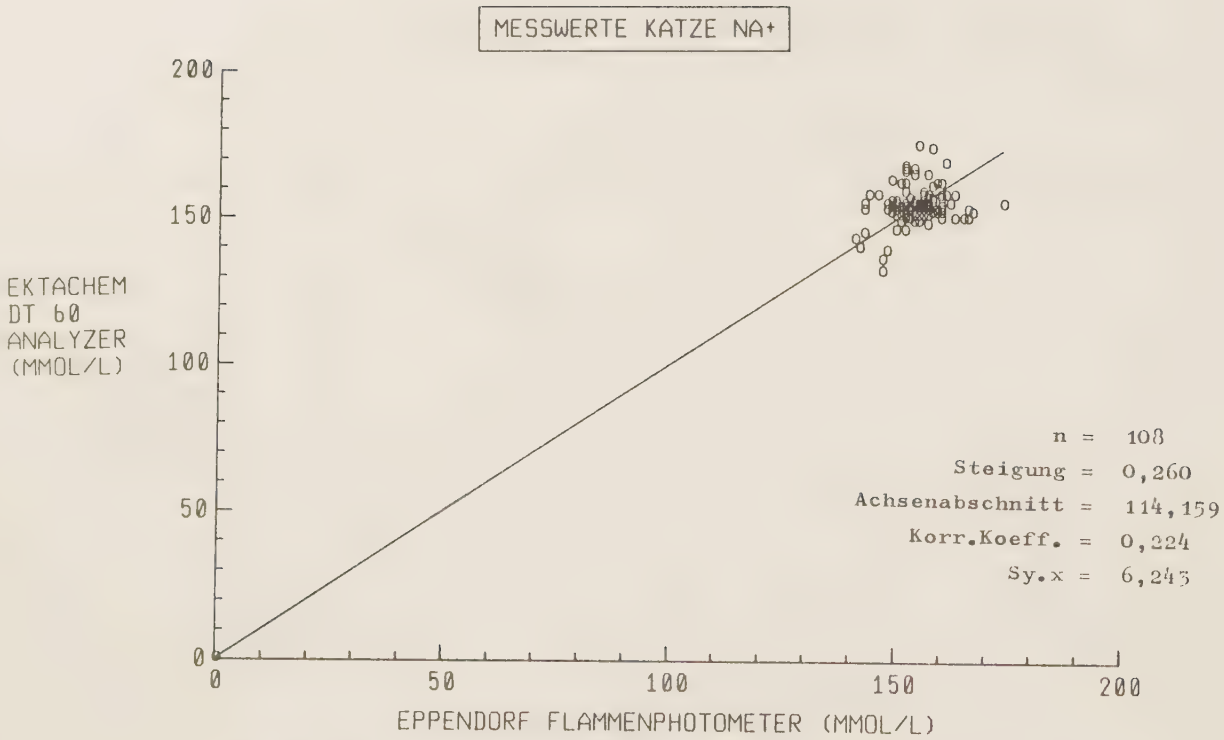


Abb.26 Natrium-Bestimmung - Katze. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode

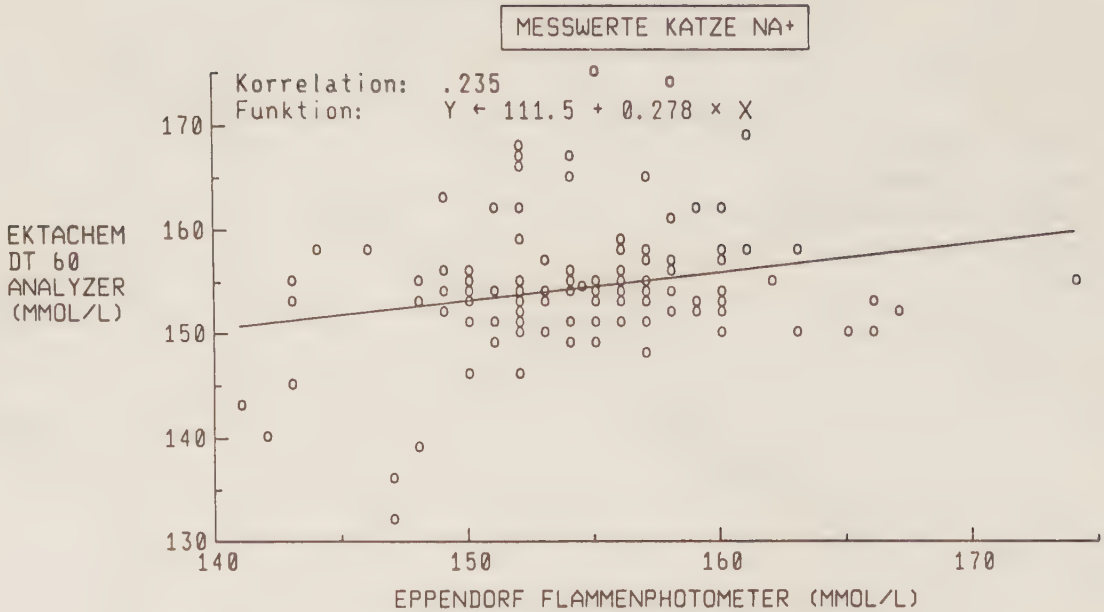


Abb.26a Natrium-Bestimmung - Katze. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode (Ausschnitt)

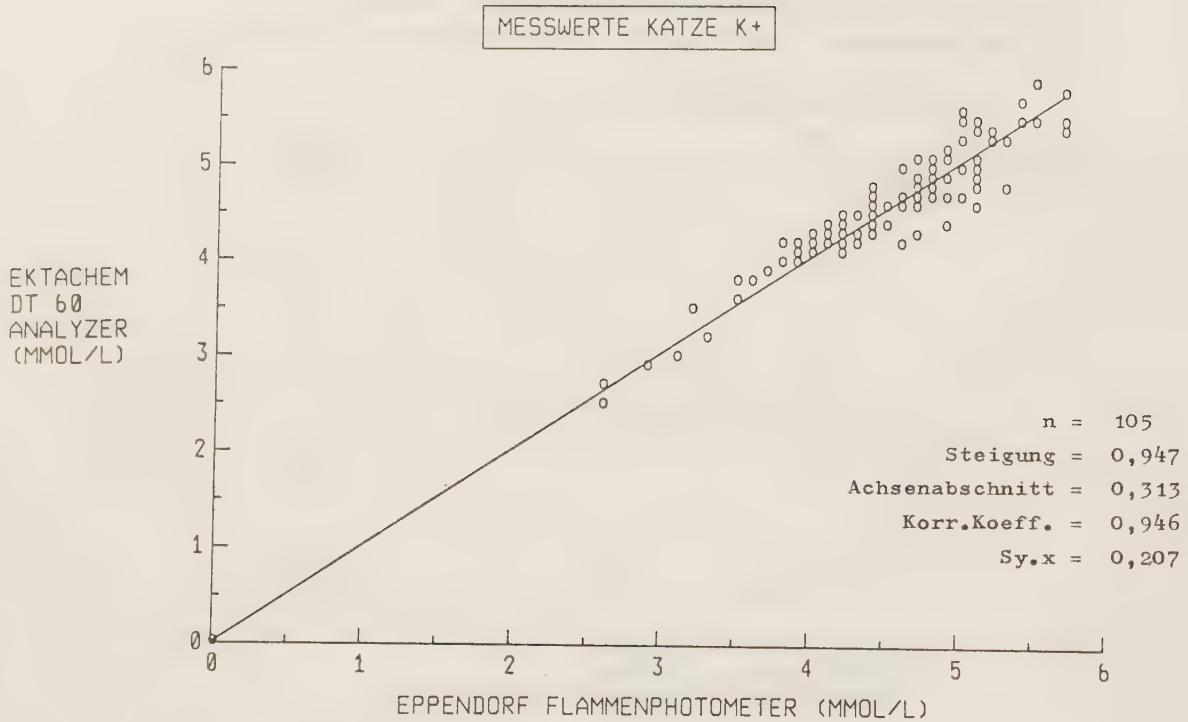


Abb.27 Kalium-Bestimmung - Katze. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode

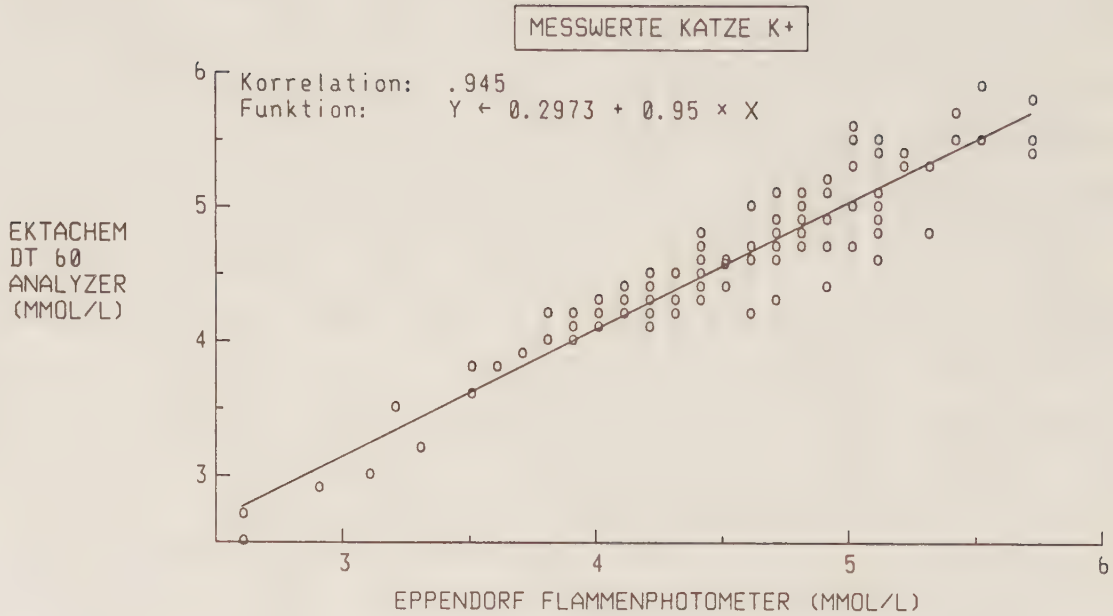


Abb.27a Kalium-Bestimmung - Katze. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode (Ausschnitt)

Tab. 10 Methodenvergleich mit Katzenserumproben:
Daten der Regressionsanalyse und des t - Tests

Test	n	Spannweite Methoden		Mittelwerte Methoden		r	Regressionsgerade y = bx + a		Sy.x
		EKTACHEM	Referenz	EKTACHEM	Referenz		b	a	
ALT	128	5- 756	8- 888	72,17	84,26	0,997	0,846	0,909	8,305
CK	108	24-7488	17-5100	318,24	219,25	0,998	1,502	-11,145	59,377
ALKP	114	26-1349	24-1316	124,42	135,25	0,986	0,871	6,641	34,117
AMYL	109	300-9504	324-8200	1195,89	1111,97	0,991	1,138	-69,939	129,486
TBIL	106	0,1-11,3	0,1-11,9	0,77	0,57	0,989	0,904	0,256	0,214
GLU	100	65- 317	74- 322	117,81	120,22	0,987	0,997	-2,089	8,208
UREA	115	20- 300	23- 274	61,86	68,64	0,944	0,952	-3,506	12,684
TP	127	4,5-10,0	4,1-10,5	7,69	7,66	0,896	0,778	1,735	0,381
CREA	106	0,3-18,8	0,4-16,2	2,21	1,91	0,984	1,181	-0,043	0,474
Na^+	108	132- 175	141- 174	154,38	154,47	0,224	0,260	114,159	6,243
K^+	105	2,5-5,9	2,6-5,7	4,57	4,49	0,946	0,947	0,313	0,207

2.2.3. Meßdaten beim Pferd

Die Ergebnisse desMethodenvergleichs mit Pferdeserumproben sind in den Abbildungen 28 - 38a und in Tabelle 11 wiedergegeben.
Beim Pferd zeigen alle EKTACHEM-Methoden - einzige Ausnahme ist die Natriumbestimmung - eine sehr hohe Korrelation mit den jeweiligen Bezugsmethoden. Die Korrelationskoeffizienten liegen zwischen 0,926 und 1,000.
Eine relativ schlechte Übereinstimmung der Werte trotz guter Korrelation fällt bei den meisten Enzymbestimmungen auf. Entweder liegen die EKTACHEM-Werte konstant höher als die Referenzwerte wie bei der

AST: ($\bar{x}_{EKT.}$ = 280,81 U/l; $\bar{x}_{Ref.}$ = 270,33 U/l;
$y = 1{,}343x - 82{,}193$; $r = 0{,}996$), der

LDH: ($\bar{x}_{EKT.}$ = 805,97 U/l; $\bar{x}_{Ref.}$ = 607,51 U/l;
$y = 1{,}576x - 151{,}400$; $r = 0{,}999$) und der

GGT: ($\bar{x}_{EKT.}$ = 30,64 U/l; $\bar{x}_{Ref.}$ = 21,15 U/l;
$y = 1{,}398x + 1{,}059$; $r = 0{,}991$)

oder es bestehen überwiegend Minderabweichungen wie bei der

AP: ($\bar{x}_{EKT.}$ = 378,55 U/l; $\bar{x}_{Ref.}$ = 421,03 U/l;
$y = 0{,}806 + 39{,}015$; $r = 0{,}984$).

Dies spricht für das Vorliegen systematischer Fehler (Tab.11).
Geringe Korrelation zeigt auch hier der Natrium-Methodenvergleich ($r = 0{,}477$). Die Gleichung der Regressionsgeraden lautet $y = 0{,}447x + 76{,}602$.

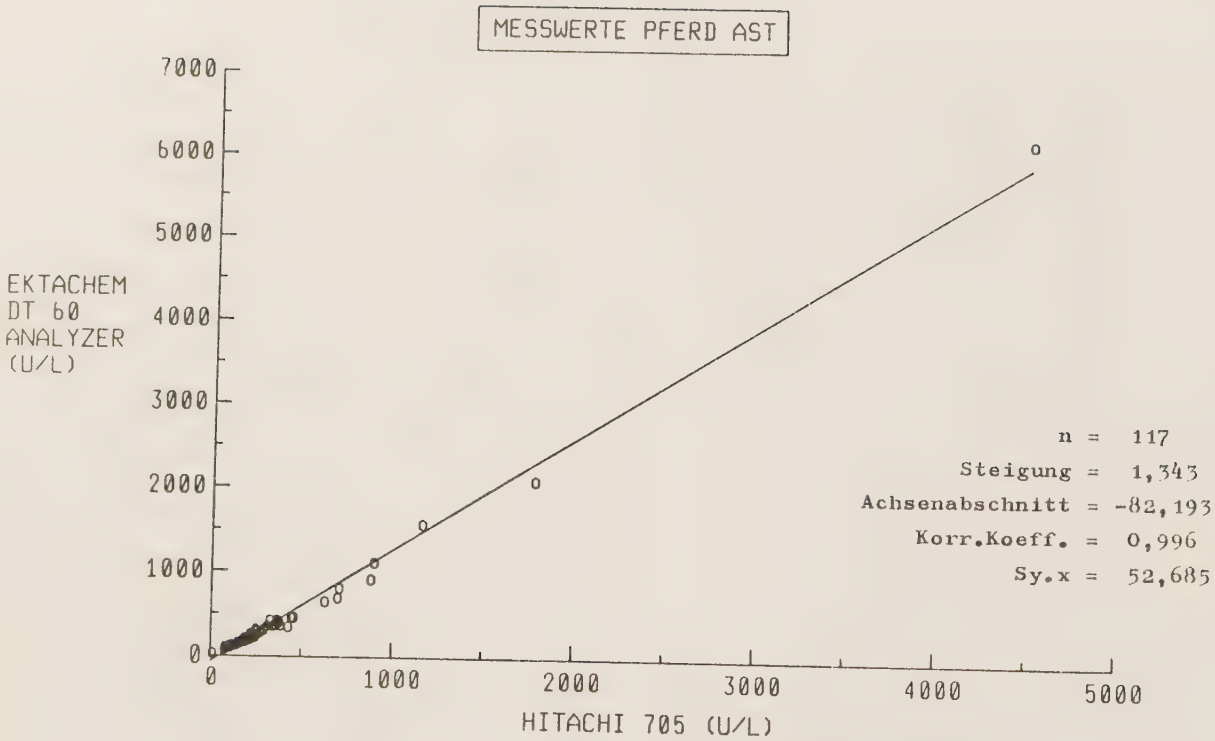


Abb.28 AST-Bestimmung - Pferd. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode

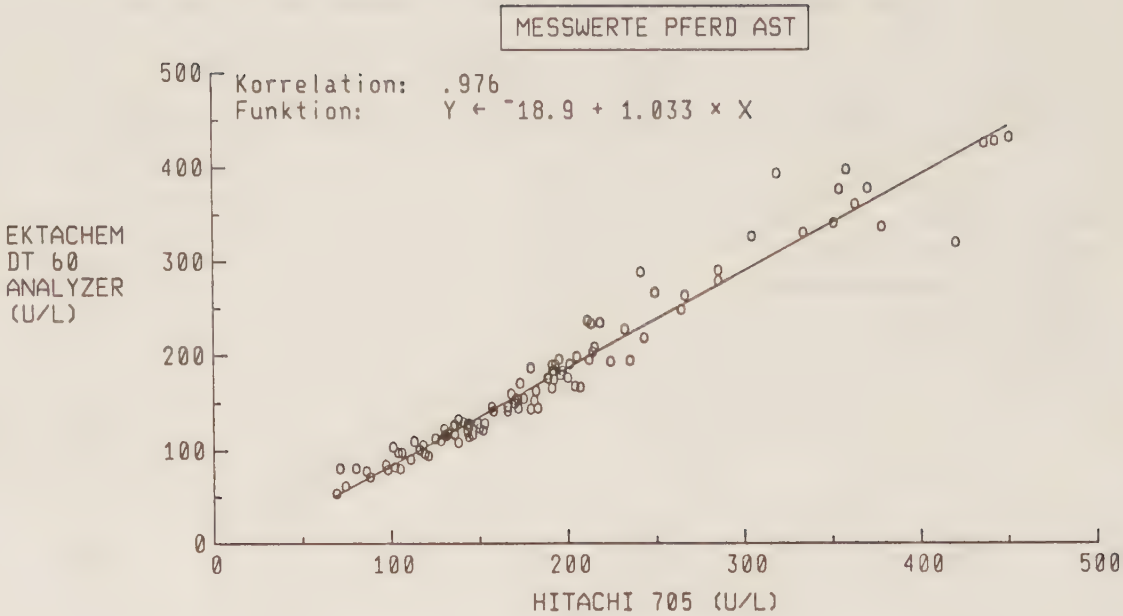


Abb.28a AST-Bestimmung - Pferd. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode (Ausschnitt)

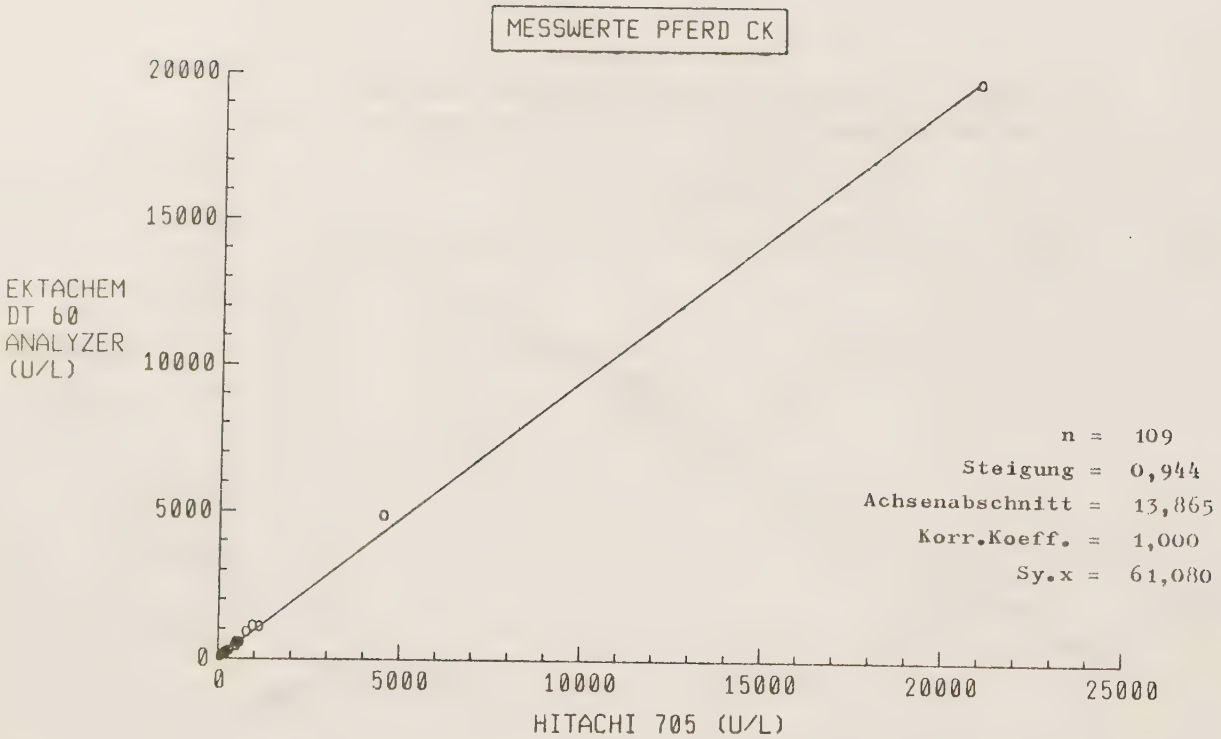


Abb.29 CK-Bestimmung - Pferd. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode

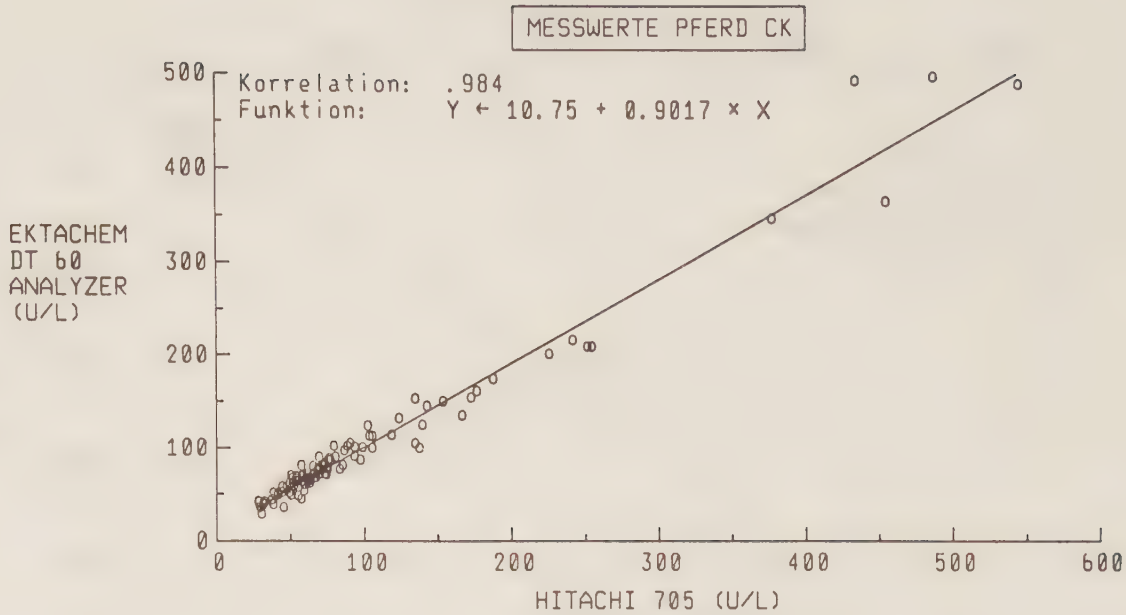


Abb.29a CK-Bestimmung - Pferd. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode (Ausschnitt)

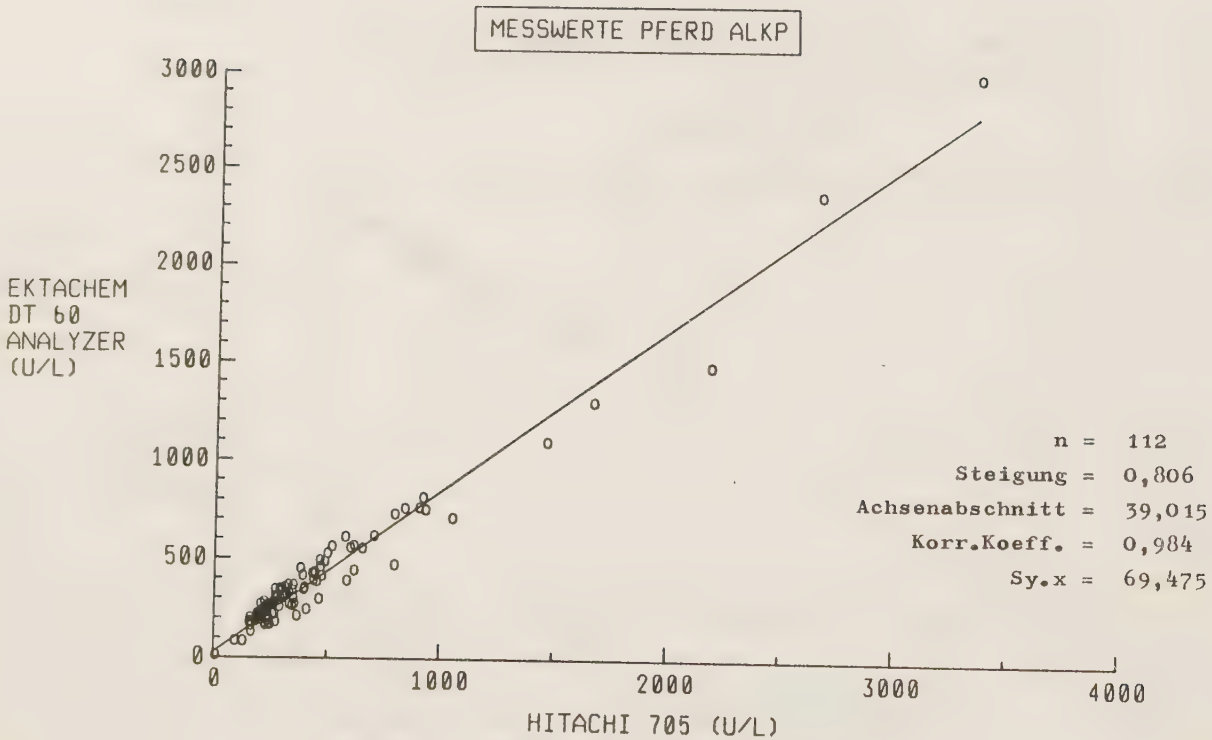


Abb. 30 AP-Bestimmung - Pferd. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode

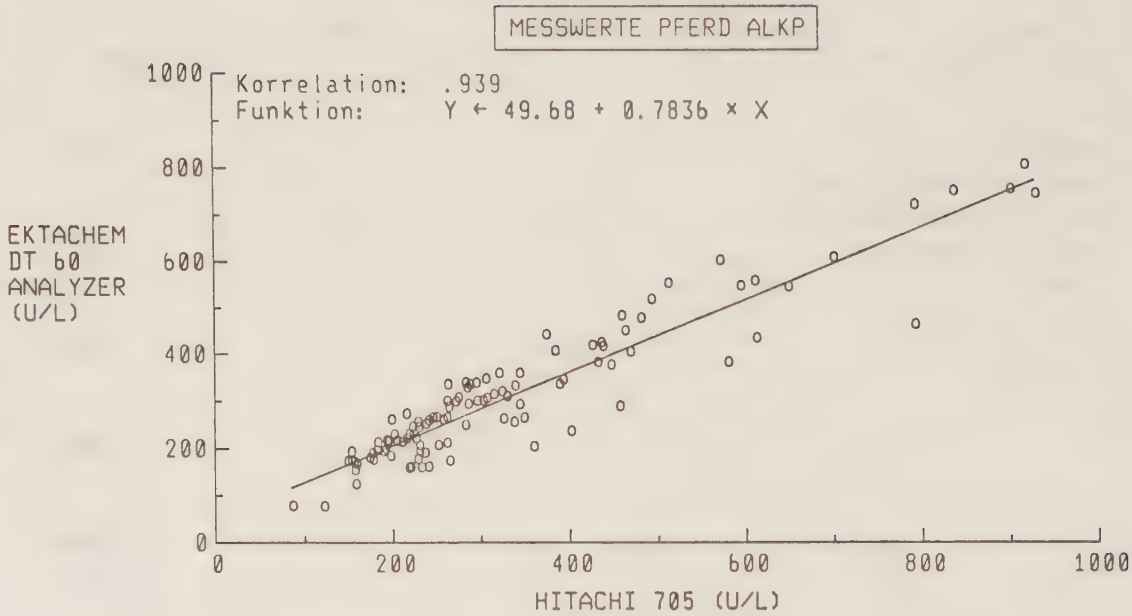


Abb.30a AP-Bestimmung - Pferd. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode (Ausschnitt)

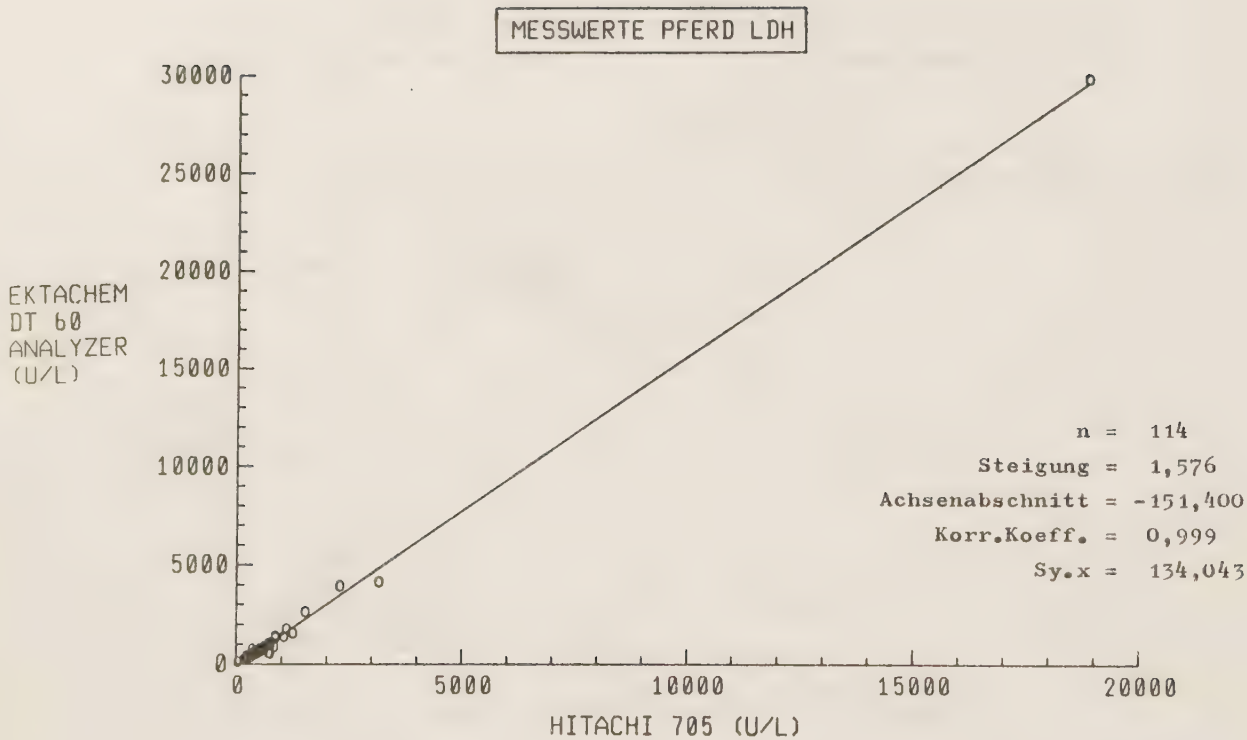


Abb.31 LDH-Bestimmung - Pferd. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode

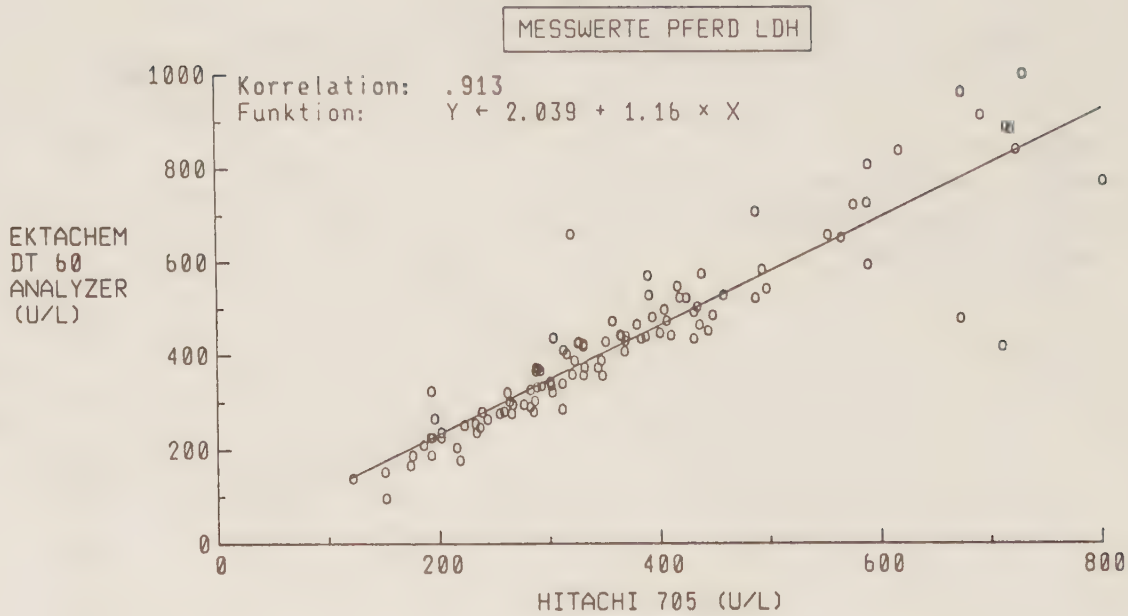


Abb.31a LDH-Bestimmung - Pferd. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode (Ausschnitt)

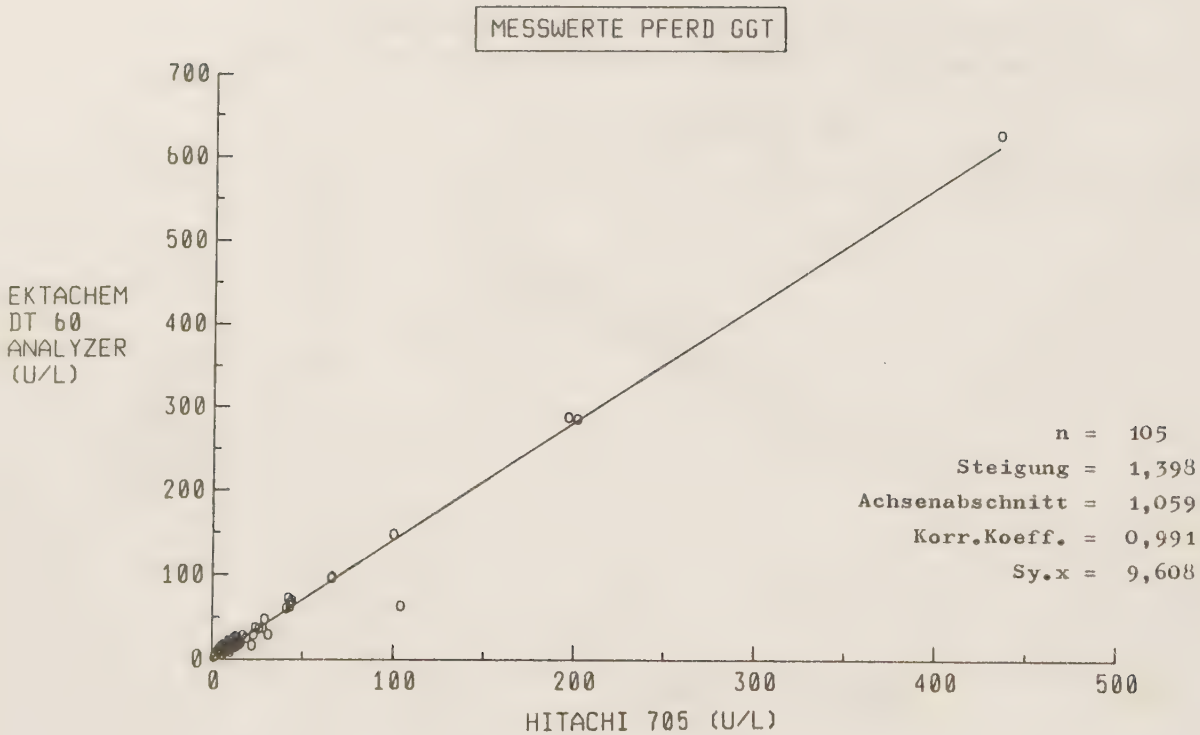


Abb.32 GGT-Bestimmung - Pferd. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode

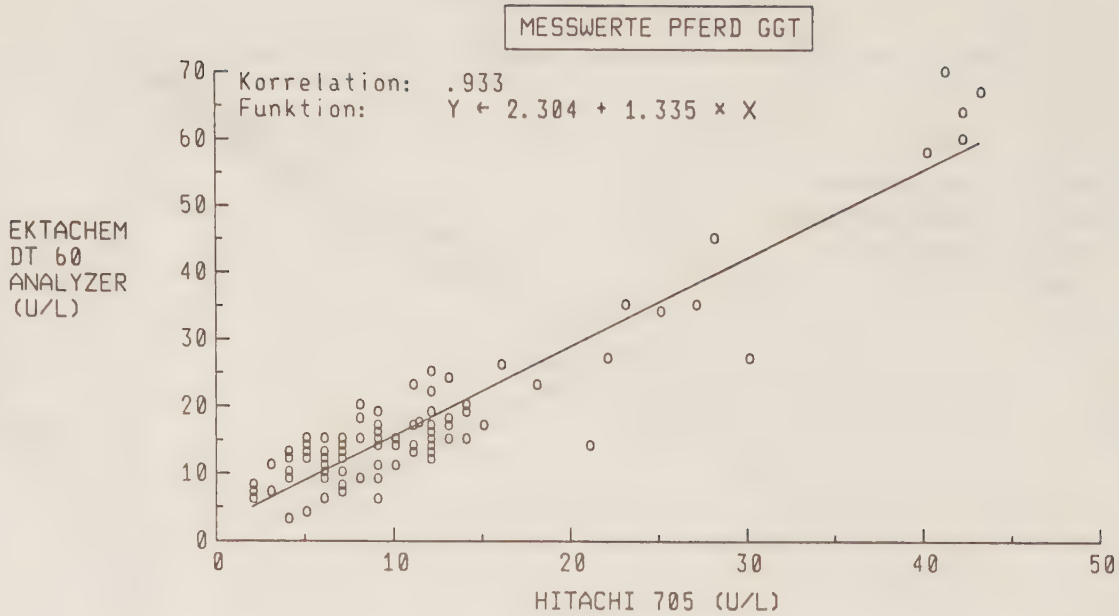


Abb.32a GGT-Bestimmung - Pferd. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode (Ausschnitt)

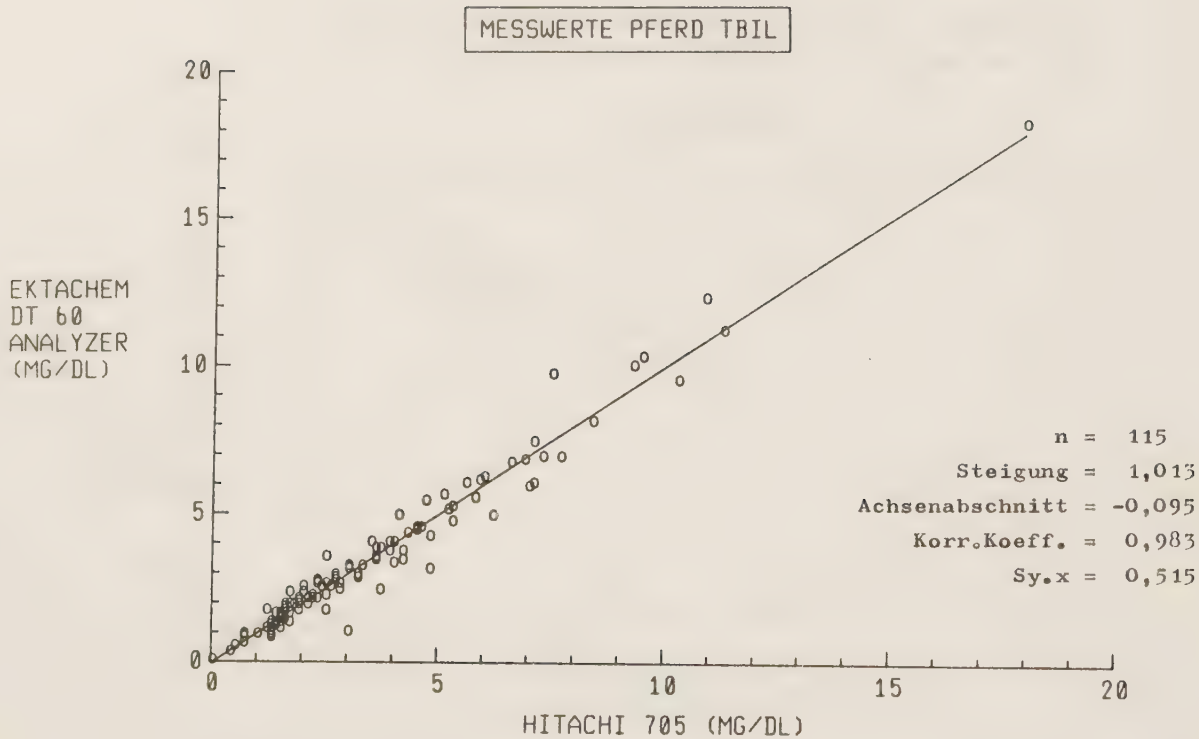


Abb.33 Gesamtbilirubin-Bestimmung - Pferd. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode

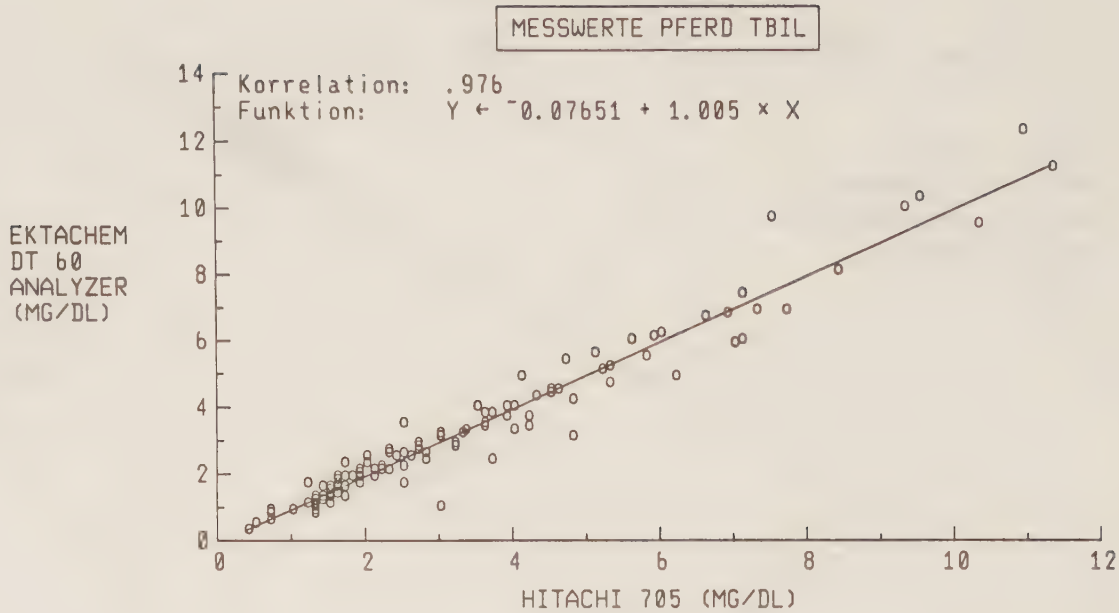


Abb.33a Gesamtbilirubin-Bestimmung - Pferd. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode (Ausschnitt)

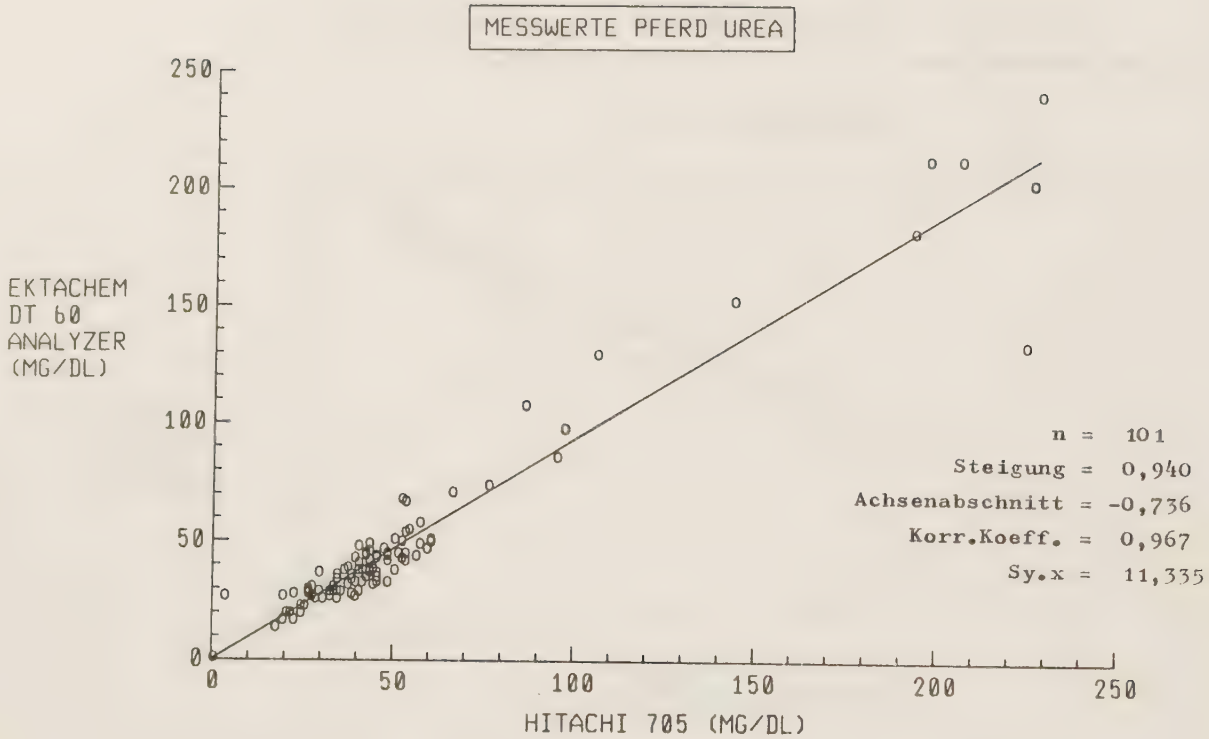


Abb.34 Harnstoff-Bestimmung - Pferd. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode

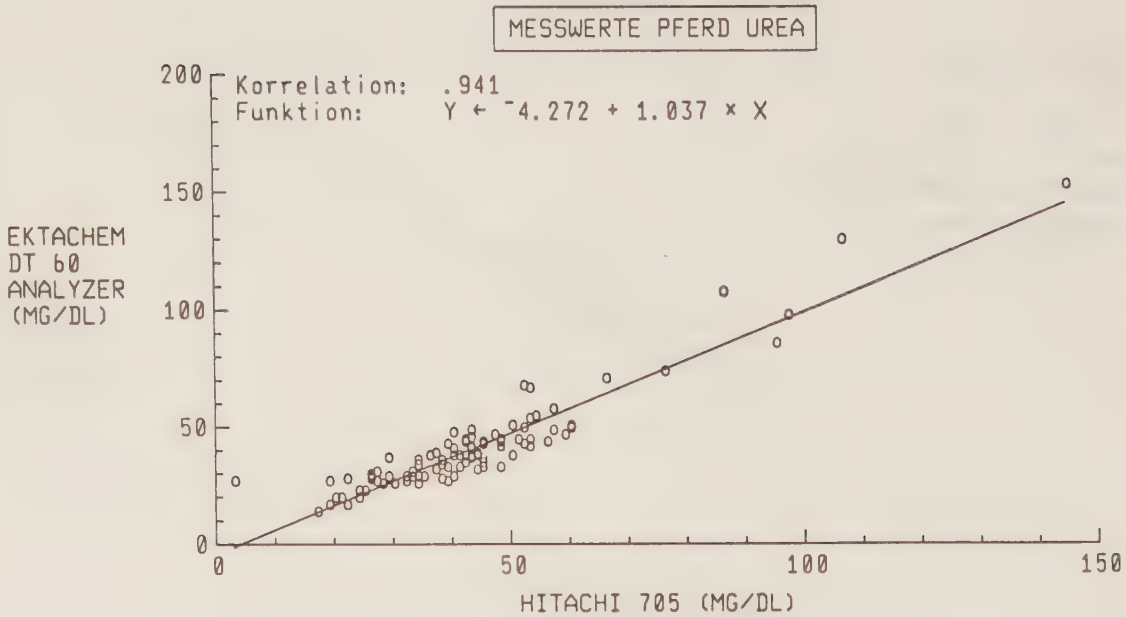


Abb.34a Harnstoff-Bestimmung - Pferd. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode (Ausschnitt)

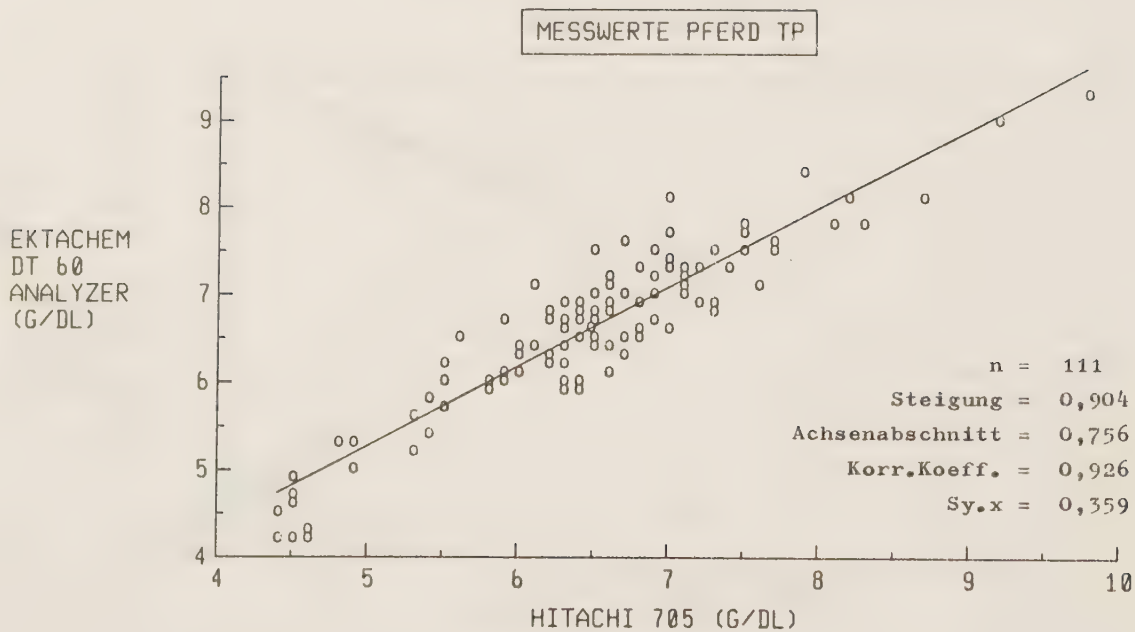


Abb.35 Gesamteiweiß-Bestimmung - Pferd. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode

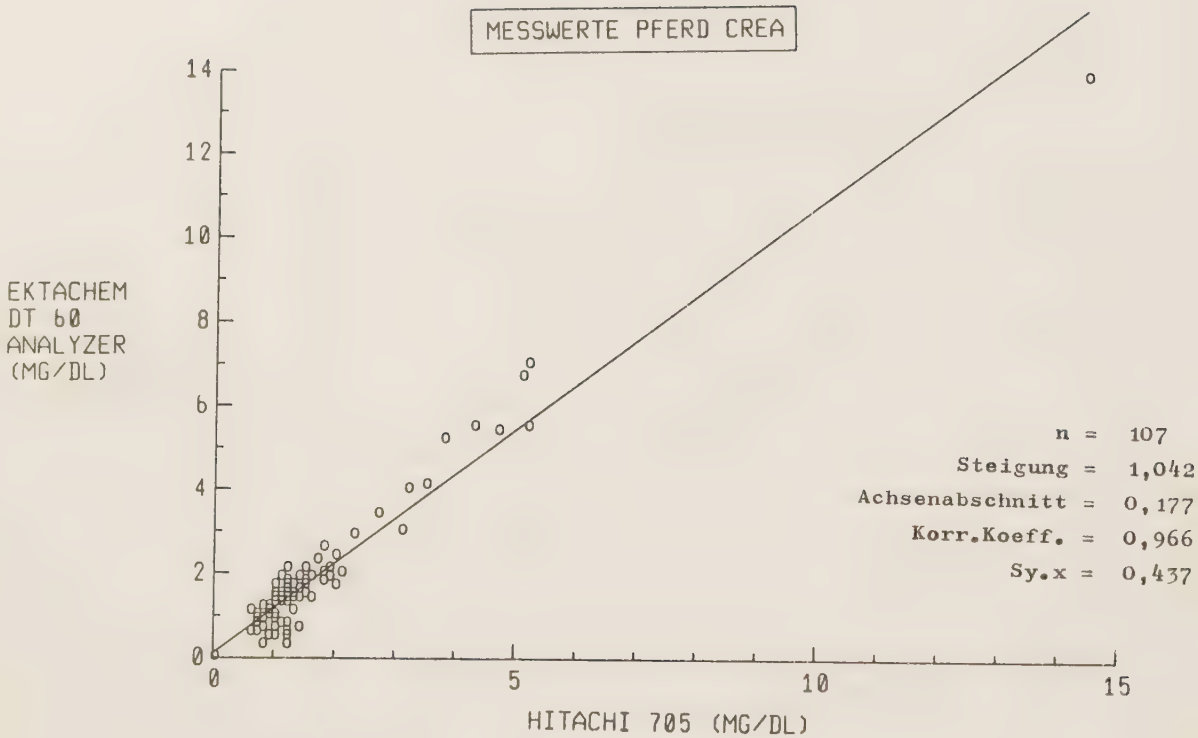


Abb.36 Creatinin-Bestimmung - Pferd. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode

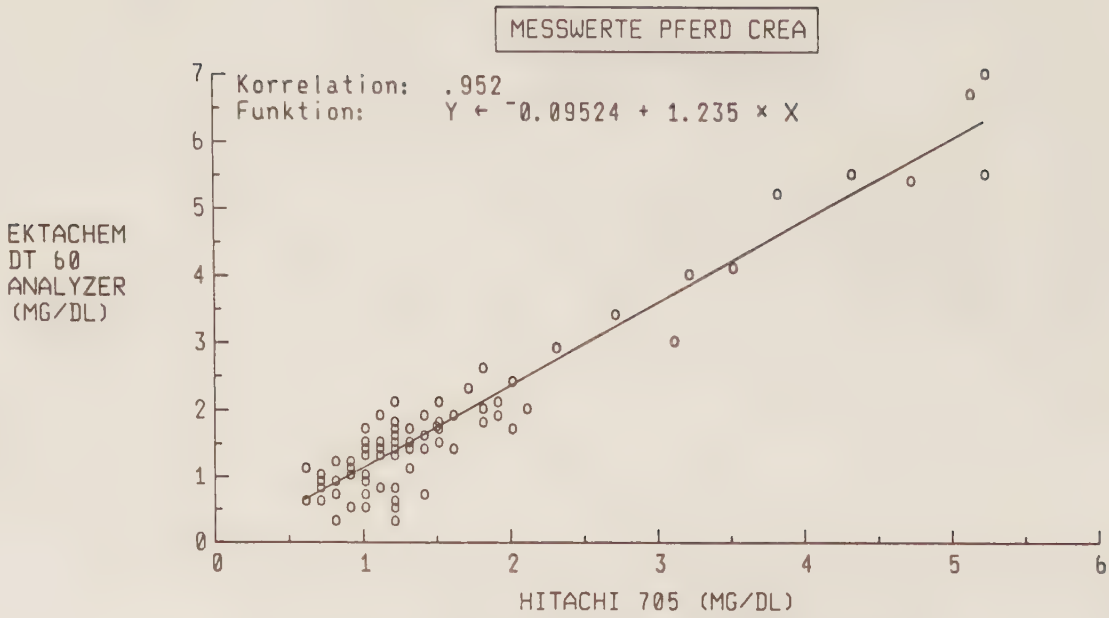


Abb.36a Creatinin-Bestimmung - Pferd. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode (Ausschnitt)

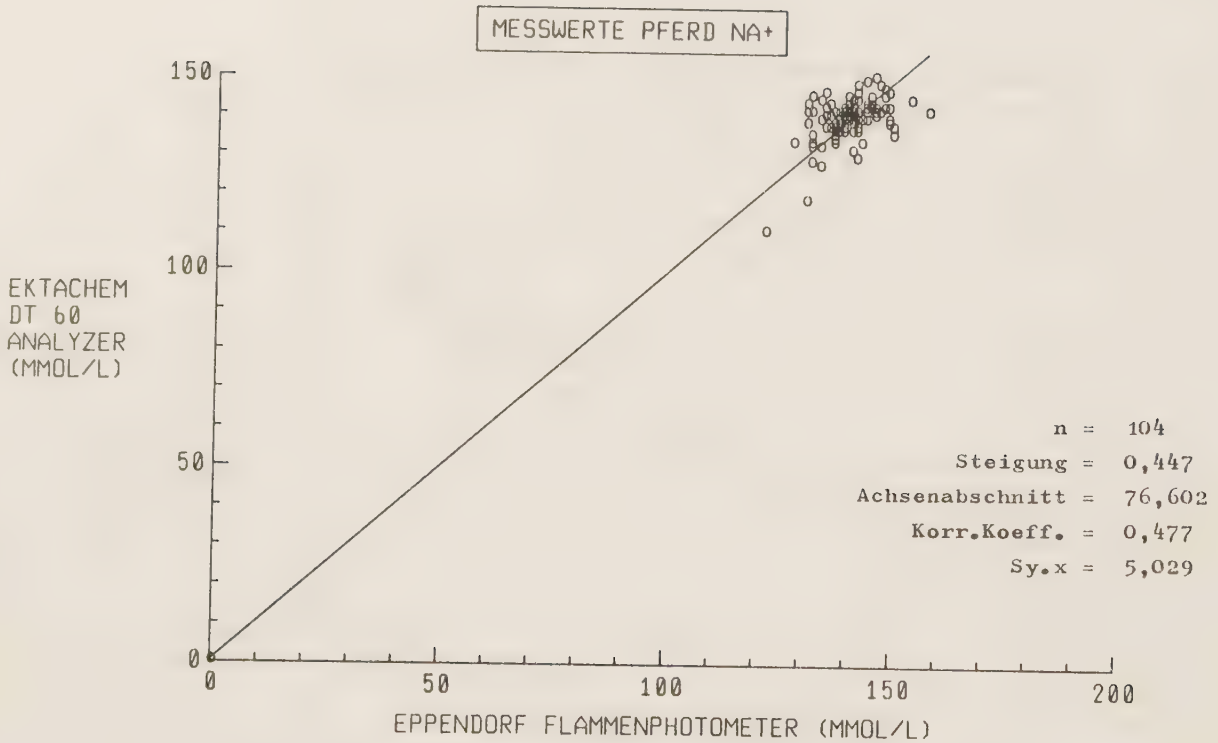


Abb.37 Natrium-Bestimmung _ Pferd. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode

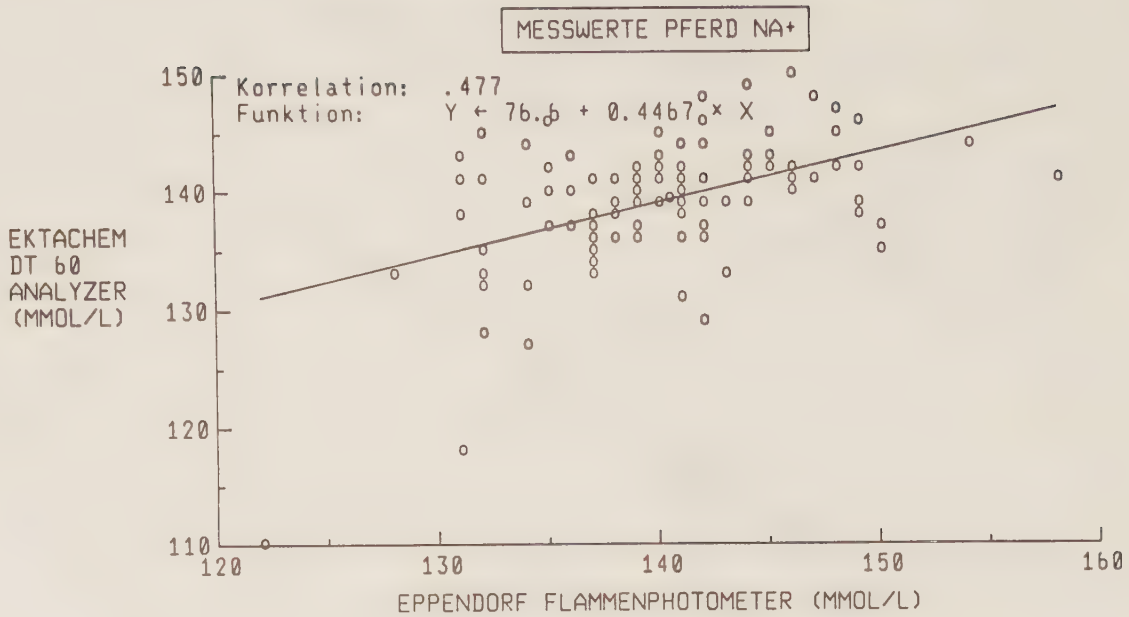


Abb.37a Natrium-Bestimmung - Pferd. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode (Ausschnitt)

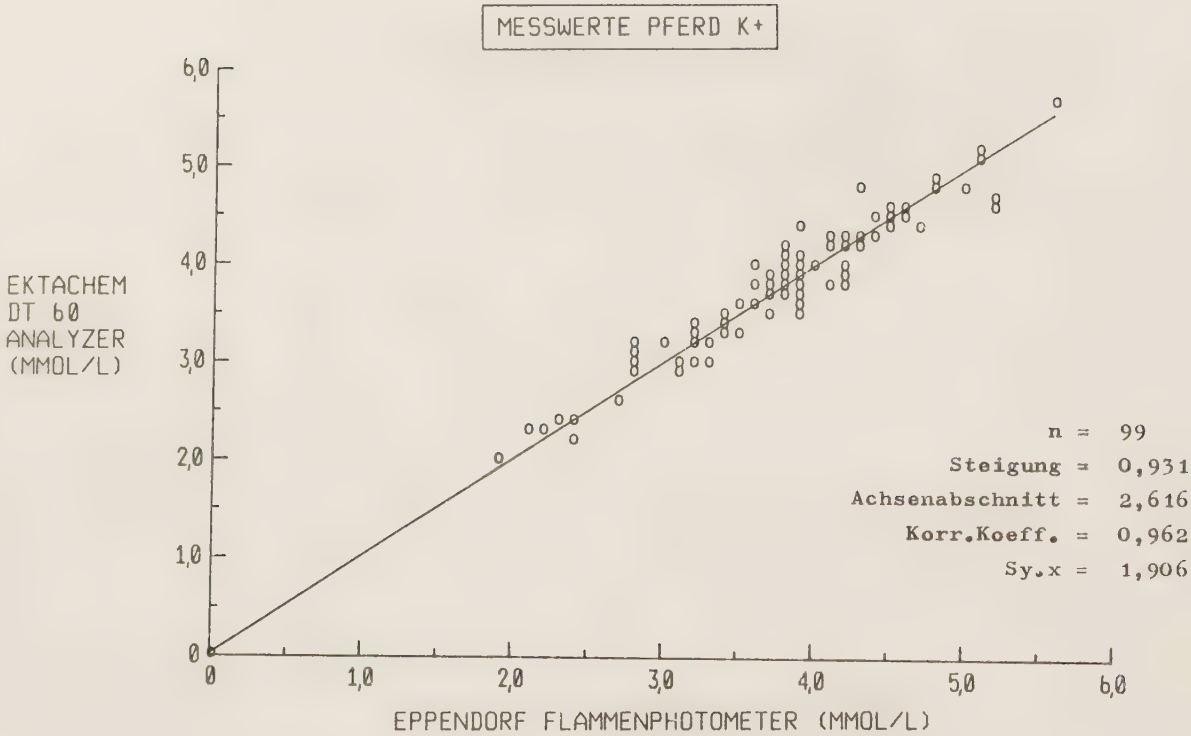


Abb.38 Kalium-Bestimmung - Pferd. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode

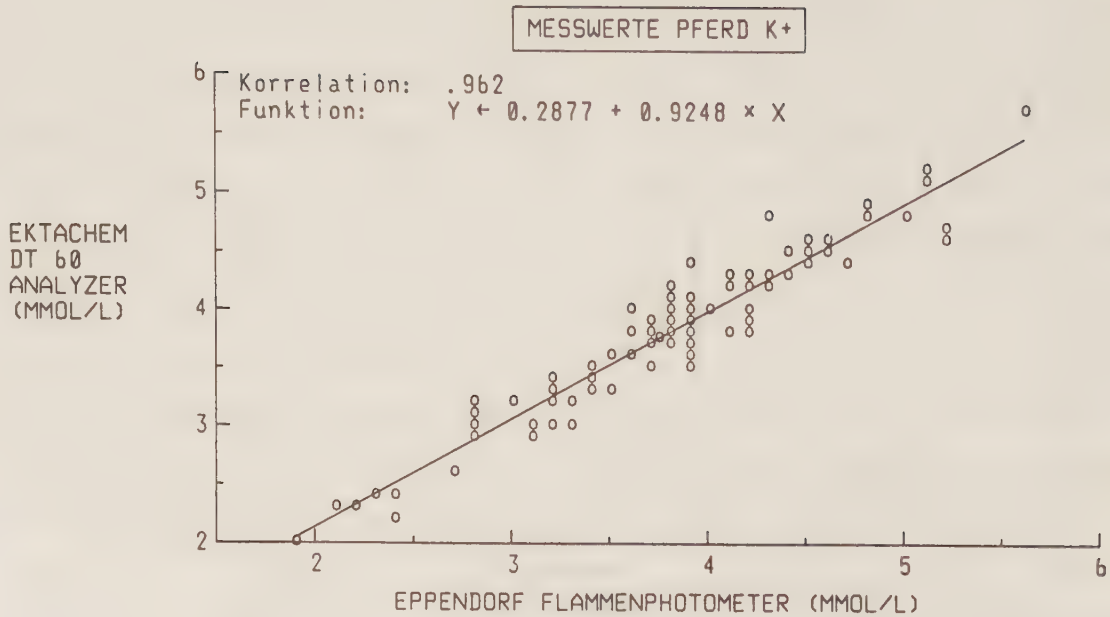


Abb.38a Kalium-Bestimmung - Pferd. Korrelationsdiagramm der Meßdaten / EKTACHEM- und Referenzmethode (Ausschnitt)

Tab. 11 Methodenvergleich mit Pferdeserumproben:
Daten der Regressionsanalyse und des t - Tests

Test	n	Spannweite Methoden		Mittelwerte Methoden		r	Regressionsgerade y = bx + a		Sy.x
		EKTACHEM	Referenz	EKTACHEM	Referenz		b	a	
AST	117	52-6188	68-4515	280,81	270,33	0,996	1,343	-82,193	52,685
CK	109	27-19686	20-20980	345,17	351,14	1,000	0,944	13,865	61,080
ALKP	112	73-2985	85-3370	378,55	421,03	0,984	0,806	39,015	69,475
LDH	114	93-29733	120-18900	805,97	607,51	0,999	1,576	-151,400	134,043
GGT	105	3- 624	2- 436	30,64	21,15	0,991	1,398	1,059	9,608
TBIL	115	0,3-18,3	0,4-18,0	3,41	3,46	0,983	1,013	-0,095	0,515
UREA	101	13- 240	17- 229	49,40	53,31	0,967	0,940	-0,736	11,335
TP	111	4,2- 9,3	4,4- 9,8	6,61	6,48	0,926	0,904	0,756	0,359
CREA	107	0,3-13,9	0,6-14,5	1,85	1,61	0,966	1,042	0,177	0,437
Na^+	104	110- 150	122- 158	139,36	140,47	0,477	0,447	76,602	5,029
K^+	99	2,0- 5,7	1,9- 5,6	3,752	3,751	0,962	0,931	2,616	1,906

2.2.4. Die untersuchten Parameter im tierartlichen Vergleich

In Tab.12 sind die wichtigsten statistischen Daten aller angestellten Methodenvergleiche noch einmal in einer Übersicht zusammengefaßt, die helfen soll, eine abschließende Bewertung durchzuführen und evtl. bestehende tierartliche Besonderheiten bei der Bestimmung einzelner Parameter zu erkennen.
Festzustellen ist, daß sämtliche vergleichenden Enzymaktivitätsbestimmungen ausgezeichnet korrelieren, von einer guten Übereinstimmung der Meßdaten jedoch nur bei der ALT (Hund, Katze), der CK (Pferd) und der AP (Hund, Katze) gesprochen werden kann. Bei den übrigen Enzymen lassen die EKTACHEM-Werte mehr oder weniger große konstant positive oder negative Abweichungen gegenüber den Referenzwerten erkennen, die auf systematische Meßfehler schließen lassen.
Auch bei den Substratbestimmungen zeigen die beiden Methoden durchweg hohe bis sehr hohe Korrelationen. Zusätzlich eine gute Richtigkeit weisen Gesamtbilirubin (Hund, Katze, Pferd), Glucose (Hund, Katze), Harnstoff (Katze, Pferd), Gesamteiweiß (Pferd) und Creatinin (Pferd) auf.
Etwas problematisch scheint der Vergleich der potentiometrischen EKTACHEM-Methode mit der flammenphotometrischen Referenzmethode für die Elektrolyt-, speziell für die Natriumbestimmung zu sein. Während beim Kalium sowohl Korrelationskoeffizienten als auch Regressionsgeradengleichun-

gen eine gute Übereinstimmung der beiden Verfahren erkennen lassen, scheint diese im Falle des Natriums nahezu vollständig zu fehlen und zwar bei allen drei Tierarten.
Eventuelle Einflüsse der verschiedenen Tierseren auf die Bestimmung der einzelnen Parameter konnten anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht festgestellt werden. In dieser Hinsicht bestehen also keine tierartlichen Unterschiede.

Tab. 12 Die untersuchten Blutparameter im Vergleich bei Hund, Katze und Pferd
(Daten der Regressionsanalyse)

Test	HUND			KATZE			PFERD		
	r	b	a	r	b	a	r	b	a
AST							0,996	1,343	-82,193
ALT	0,994	0,829	0,058	0,997	0,846	0,909			
CK	0,988	1,553	-29,094	0,998	1,502	-11,145	1,000	0,944	13,865
ALKP	0,979	0,934	28,161	0,986	0,871	6,641	0,984	0,806	39,015
LDH							0,999	1,576	-151,400
GGT							0,991	1,398	1,059
AMYL	0,977	0,876	102,452	0,991	1,138	-69,939			
TBIL	0,987	1,001	-0,034	0,989	0,904	0,256	0,983	1,013	-0,095
GLU	0,963	0,906	6,950	0,987	0,997	-2,089			
UREA	0,976	1,193	-14,609	0,944	0,952	-3,506	0,967	0,940	-0,736
TP	0,908	0,873	1,052	0,896	0,778	1,735	0,926	0,904	0,756
CREA	0,988	1,209	-0,111	0,984	1,181	-0,043	0,966	1,042	0,177
Na^+	0,155	0,226	112,883	0,224	0,260	114,159	0,477	0,447	76,602
K^+	0,861	0,900	0,537	0,946	0,947	0,313	0,962	0,931	2,616

IV. D I S K U S S I O N

Die Präzision der trockenchemischen Bestimmungsverfahren, mit denen das KODAK EKTACHEM DT60 Analysengerät arbeitet, wurde durch Wiederholungsmessungen (n = 10) verschiedener Hunde-, Katzen- und Pferdeseren ermittelt. Mit Werten der Variationskoeffizienten zwischen 0,39 und 6,24 % für die Präzision in der Serie, wobei bis auf zwei Meßreihen (Gesamtbilirubin und Creatinin, Katze) alle unterhalb der 5 % - Grenze liegen, und Variationskoeffizienten der Präzision von Tag zu Tag, die - läßt man einmal die Parameter Gesamtbilirubin und Creatinin ganz außer acht - von 0,92 bis 6,39 % reichen, sind die Ergebnisse der Präzisionsstudien durchaus mit denen naßchemischer Methoden vergleichbar, wenn nicht sogar besser. Dies gilt für die Seren aller drei Tierarten (Tab. 3 - 8).
Zu den hohen, teilweise sehr hohen Variationskoeffizienten der Gesamtbilirubin- und Creatininmessungen ist zu sagen, daß die untersuchten Konzentrationen (0,13 - 2,58 mg/dl bzw. 1,05 - 1,91 mg/dl) jeweils an der Untergrenze der Meßbereiche des Analyzers liegen und sich bei solch niedrigen Werten selbst kleine Schwankungen innerhalb der Meßreihe in höheren VK-Prozentzahlen niederschlagen. Zum Bilirubin ist ferner zu bemerken, daß gerade dieser Blutparameter, trotz Aufbewahrung des Serums

bei -18 Grad C, bereits nach zwei Wochen deutliche Konzentrationsänderungen aufweist, die eine Abnahme der Richtigkeit und natürlich auch der Präzision zur Folge haben[80]. Meine Untersuchungen zur Präzision von Tag zu Tag erstreckten sich aber über einen Zeitraum von etwa zwei Monaten.

Durch Methodenvergleich wurde die Richtigkeit überprüft. Dabei wurde die Übereinstimmung der mit den EKTACHEM-Methoden erzielten Meßdaten mit den durch anerkannte (naßchemische) Referenzmethoden erhaltenen Werten untersucht. Patientenproben von Hunden, Katzen und Pferden fanden dazu Verwendung und zwar mindestens 100 pro Parameter und Tierart.
Die Korrelationskoeffizienten dieser Methodenvergleiche liegen für alle Tests zwischen 0,861 und 1,000, zeigen also hohe, zumeist sogar sehr hohe Korrelationen der beiden Verfahren an. Einzige Ausnahme bildet bei allen Tierarten die Natriumbestimmung, die Korrelationskoeffizienten von lediglich 0,155 bis 0,477 - also kaum linearen Zusammenhang - aufweist.
Eine zusätzliche gute Übereinstimmung der Meßwerte - im Idealfall angezeigt durch eine Regressionsgerade, die eine Steigung von b = 1 besitzt und durch den Schnittpunkt von x- und y-Achse verläuft (a = 0) - liegt nur in etwa der Hälfte der Fälle vor:
ALT - Hund, Katze / CK - Pferd / AP - Hund, Katze / Gesamtbilirubin - Hund, Katze, Pferd / Glucose - Hund, Katze / Harnstoff - Katze, Pferd / Gesamteiweiß - Hund, Pferd / Creatinin - Pferd / Kalium - Hund, Katze, Pferd (Tab. 9 - 11).

Bei den übrigen Tests können jedoch diese durch systematische Fehler bedingten Abweichungen durch Einspeicherung der entsprechenden Regressionsgeraden in den Mikrocomputer des DT 60 Analyzers problemlos behoben und so die EKTACHEM- weitgehend den Referenzmethoden angeglichen werden. Damit wäre dann auch die Forderung nach Richtigkeit bei den trockenchemischen Verfahren erfüllt.
Zur Problematik der Elektrolyt-, speziell der Natriumbestimmung ist zu bemerken, daß auch bereits in anderen wissenschaftlichen Arbeiten auf ähnliche Schwierigkeiten bei der Untersuchung dieses Parameters in Humanseren hingewiesen wurde, gerade wenn man die Flammenphotometrie als Bezugsmethode gewählt hatte[1,15,44,51].
Jack et al. (1987) sehen eines der Probleme darin, daß es bei diesem Methodenvergleich besser wäre, die lineare Regression nicht wie üblich nach der Methode der kleinsten Quadrate zu berechnen, bei der x die unabhängige und y die abhängige Variable darstellt, sondern nach der Methode von Deming, die eine Veränderlichkeit beider Variablen zugrunde legt, was sicherlich realistischer ist.
Eine Regression nach Deming ist in folgenden Fällen anzuwenden:

1. Wenn die Wertepaare in Form einer Punktewolke zusammenliegen oder nur einen relativ begrenzten Meßbereich umfassen.
2. Wenn die Fehlermöglichkeiten in der Referenzmethode x gleich oder größer als diejenigen in der zu untersuchenden Methode y sind.

Wenn diese beiden Voraussetzungen erfüllt sind -

und dies ist bei der vorliegenden Natriumbestimmung sicherlich der Fall - wird die normalerweise durchgeführte Regressionsanalyse vermutlich die wahre Steigung der Regressionsgeraden unterschätzen, also zu niedrige Werte geben[54]. Meine Ergebnisse zeigen Regressionskoeffizienten b von 0,226 bis 0,447.

Allerdings kann die schlechte Übereinstimmung der Resultate beim Natrium-Methodenvergleich nicht allein durch eine falsche statistische Auswertung erklärt werden, vielmehr müssen auch die beiden völlig unterschiedlichen Meßtechniken in Betracht gezogen werden, hier die direkte Potentiometrie, dort die Flammenphotometrie. Während letztere die Elektrolytkonzentration in einem genau festgesetzten Volumen verdünnten Serums mißt, wird durch die ionenselektiven Elektroden der EKTACHEM-Plättchen mittels direkter Potentiometrie die Ionenaktivität in unverdünntem Serum gemessen und anschließend in Konzentrationseinheiten umgerechnet[15].

Mögliche Unterschiede zwischen den beiden Methoden können einmal durch Volumenverdrängung, zum anderen durch Natrium-bindende Effekte verursacht werden. Die häufig durch flammenphotometrische Messung festgestellte Pseudohyponatriämie wird vorgetäuscht durch hohe Konzentrationen an Proteinen, Triglyceriden und anderen Bestandteilen, die einen Teil des Serumwassers und damit auch der darin befindlichen Elektrolyte verdrängen. Die potentiometrische Aktivitätsmessung wird durch diesen Volumensverdrängungseffekt stark lipämischer oder proteinämischer Seren nicht beeinflußt, gibt also den wahren Elektrolytstatus wieder.

Eine Komplexbildung des Natriums (und auch des Kaliums) mit Bicarbonat kann besonders bei erhöhten Bicarbonatkonzentrationen eine negative Abweichung der mit ionenselektiven Elektroden gemessenen Natrium- (Kalium-) werte gegenüber der Flammenphotometrie bewirken, da Natrium- (Kalium-) bicarbonat in Lösung nicht vollständig dissoziiert ist und sich somit einer potentiometrischen Bestimmung entzieht[51].
Verschiedentlich wird die Ansicht vertreten, daß die direkte Potentiometrie die Elektrolytkonzentration verläßlicher wiedergibt, da physiologischerweise protein-, komplex- oder elektrostatisch gebundene Ionen vermutlich auch nicht berücksichtigt werden und es die Ionenaktivität ist, die das Membranpotential und den osmotischen Druck bestimmt.

Um mit der Flammenphotometrie besser vergleichbare Werte zu erhalten, wurde empfohlen, die gemessenen Aktivitäten mit einem geeigneten Faktor zu multiplizieren[51].

Die vom Hersteller angegebenen weiten Linearitätsbereiche wurden zwar keiner eigenen Prüfung unterzogen, doch konnten sie durch die ausgeführten Messungen insofern bestätigt werden, als Verdünnungen immer erst im Bereich der angegebenen Obergrenzen notwendig wurden. Für nahezu alle Parameter decken die Meßbereiche die jeweiligen Referenzbereiche der drei Tierarten z.T. um ein Vielfaches ab (vgl.Tab.1 und 2). Lediglich bei der α-Amylase übersteigen die Normalbereiche von Hund und Katze den Linearitätsbereich des Analyzers deutlich, was in mindestens

50 % der Fälle eine Verdünnung der Patientenprobe erforderlich machte. In diesem Zusammenhang soll auch noch das Gesamtbilirubin erwähnt werden, bei dem die Normalwerte der Kleintiere an der Untergrenze des Meßbereichs liegen, manchmal sogar darunter, was für die klinische Diagnostik jedoch irrelevant ist. Laut Shirey (1986) besitzt der EKTACHEM DT 60 Analyzer für die meisten Analyten einen weiteren Linearitätsbereich als vergleichbare Geräte[76].

Umfangreiche Interferenzstudien[43] wurden bereits angestellt, die alle ziemlich einhellig ergaben, daß der mehrschichtige Aufbau der EKTACHEM-Analysenplättchen, der neben dem schrittweisen Reaktionsablauf auch eine weitgehende Ausschaltung von Fehlerquellen mit sich bringt, verbunden mit der reflexionsphotometrischen Messung von der der Probenaufgabe entgegengesetzten Plättchenseite her, eine äußerst geringe Störanfälligkeit dieser trokkenchemischen Bestimmungen zur Folge hat. Besonders gegenüber den häufigsten Störeinflüssen durch erhöhte Triglycerid-, Hämoglobin- und Bilirubinkonzentrationen sind diese Trockenreagenzträger nahezu unempfindlich[49,50,64,71]. Auch während meiner sechsmonatigen Arbeit mit dem DT 60 Analyzer konnte ich keine gegenteiligen Beobachtungen machen.

Schwierigkeiten bei der Untersuchung von Tierseren mit diesem für die Humanmedizin konzipierten Analysensystem traten nicht auf und auch tierartliche Unterschiede in der Bestimmung einzelner Blutparameter konnten nicht festgestellt werden.

Ähnliche Angaben liegen aus einer Arbeit von Emmons et al. (1985) vor, die verschiedene Analyten bei sieben Tierspezies mit dem nach demselben Prinzip arbeitenden EKTACHEM 700 Auatoanalyzer untersuchten. Recht positiv über den DT 60 Analyzer äußerten sich auch Shull (1985) - der jedoch lediglich Präzisionsstudien für drei Parameter aus Pferdeseren durchführte - und Lutz et al. (1988) - die in einer Übersichtsstudie 15 Parameter mit jeweils ca 20 Seren bei vier Tierarten (Rind, Pferd, Hund und Katze) auf Übereinstimmung mit laboreigenen Bezugsmethoden überprüften.

Aufgrund der Ergebnisse meiner Untersuchungen kann ich zusammenfassend feststellen, daß sich das EKTACHEM DT60 Analysengerät sehr gut für die Bestimmung zumindest der hier getesteten Parameter aus Tierseren (Hund, Katze, Pferd) eignet. Die trokkenchemischen Methoden verfügen über eine ausgezeichnete Präzision, und ihre noch nicht in jedem Falle gegebene gute Richtigkeit sollte - einmal abgesehen vom Natrium - durch Eingabe von Korrekturfaktoren erzielt werden können. Damit stellen sie eine brauchbare Alternative zu den naßchemischen Methoden dar. Dies deckt sich auch mit den Resultaten, die bereits mehrfache Prüfungen dieses Trokkenchemiesystems mit Humanseren erbracht haben[1,38,44,61,71,88,94]. So ist das DT60 Analysengerät sicherlich für die Verwendung in der tiermedizinischen Labordiagnostik zu empfehlen, zumal es neben der Zuverlässigkeit, die die Voraussetzung für seinen Einsatz darstellt, noch eine Reihe weiterer Vorteile besitzt, die hier noch einmal kurz erwähnt werden

sollen:

- Die Bedienung des Gerätes ist sehr einfach, die Einarbeitungszeit vernachlässigbar klein.
- Der Arbeitsplatzbedarf für dieses Tischgerät beträgt incl. der beiden Zusatzmodule knapp 0,9 m^2.
- Die Lagerhaltung der Reagenzien beansprucht relativ wenig Raum, erfordert allerdings einen Kühlschrank mit Gefrierfach (für Kalibrator-, Referenz- und Kontrollflüssigkeiten, sowie CK- und Amylaseplättchen).
- Etwa eine halbe Stunde nach dem Einschalten ist das Gerät betriebsbereit - auch für Dauereinsatz. In der Anwärmphase führt es einen Selbsttest durch. Während des Arbeitsablaufs kann es von der Bedienungsperson jederzeit verlassen werden, ohne daß dieser unterbrochen werden muß.
- Kalibrierungen sind im laufenden Betrieb nur alle drei Monate notwendig, was verschiedentlich überprüft wurde und auch durch eigene Erfahrungen bestätigt werden kann. Chargenänderungen der Testplättchen oder unzulässige Abweichungen der Ergebnisse einzelner Parameter bei der regelmäßig durchgeführten Qualitätskontrolle machen Neukalibrierungen erforderlich.
- Die Trockenreagenzträger sind gebrauchsfertig einzeln verpackt und mindestens 12 Monate haltbar. Der Zeitaufwand und die Fehlermöglichkeiten beim Ansetzen von Reagenzlösungen, sowie deren u.U. vorzeitiger Verderb entfallen.
- Für jede Bestimmung werden nur 10 μl unverdünnte Probenflüssigkeit benötigt (kein Verdünnungsfehler). Geeignet sind Serum und Plasma, z.T. auch Urin und Liquor. Die Verwendung anderer Körperflüssigkeiten wurde untersucht[21] und für die Be-

stimmung von Glucose und Harnstoff aus Vollblut existieren bereits modifizierte Analysenplättchen[14,20].

- Der maximale Durchsatz beträgt nahezu 100 Tests pro Stunde (65 Substrat-, 15 Elektrolyt- und 15 Enzymbestimmungen).
- Alle Tests können in beliebiger Reihenfolge durchgeführt werden. Ein besonderer Vorteil des DT60 Analyzers gegenüber anderen vergleichbaren Trockenchemiegeräten ist seine Fähigkeit, mehrere Analysen gleichzeitig ausführen zu können: Bis zu sechs kolorimetrische Plättchen vermag der Inkubator des Analyzers aufzunehmen und daneben kann das DTE-Modul ein potentiometrisches und das DTSC-Modul ein Enzymplättchen bearbeiten.
- Das Ergebnis wird automatisch ausgedruckt - wenn gewünscht zusammen mit Datum und Patientennummer. Damit sind Übertragungs- und Verwechslungsfehler ausgeschlossen.
- Das EKTACHEM-System bietet das wohl umfangreichste Testspektrum der Trockenchemie. Neben den hier untersuchten Parametern können noch Albumin, Ammoniak, Calcium, Cholesterin, Harnsäure, Lipase, Magnesium, Phosphor, Triglyceride, CO_2 und Chlorid - um nur die wichtigsten zu nennen - bestimmt werden. Außer diesen klinisch-chemischen sind auch pharmakologische Tests - z.B. für Phenobarbital oder Theophyllin - im Handel.
- An der Verbesserung (mittlerweile gibt es einen Creatinintest, der nur noch ein Plättchen benötigt[64]) und Neuentwicklung der Trockenreagenzträger wird ständig gearbeitet. Neu hinzukommende

Parameter können problemlos durch Auswechseln des entsprechenden Mikrochips im Analysengerät adaptiert werden.

Neben all diesen positiven Aspekten sollen jedoch auch einige Nachteile der trockenchemischen Analytik aufgezeigt werden:

- Man begibt sich in eine gewisse Abhängigkeit vom jeweiligen Hersteller, da nur geschlossene Systeme, bestehend aus - wie z.B. bei der Firma Kodak - Analysenplättchen, Reflexionsphotometer und Kalibrator, angeboten werden, bei denen nicht einmal die Eichflüssigkeiten ausgetauscht werden können[86]. Systemimmanente Fehler bleiben bei diesem Prinzip möglicherweise unerkannt[60].
- In vielen Richtigkeitskontrollseren sind Sollwertangaben für diese Systeme noch nicht vorhanden.
- Eine Teilnahme an externen Qualitätskontrollprogrammen ist nicht immer möglich[86].
- Relativ hoch ist gerade auch beim KODAK EKTACHEM DT60 Analysengerät der Anschaffungspreis (komplett DM 29.000.-). Die Kosten pro Analyse sind abhängig von der Art des untersuchten Parameters und der Anzahl der Bestimmungen pro Tag und bewegen sich etwa zwischen DM 2.- und 4.-. Damit liegen sie sicherlich über denen einer naßchemischen Bestimmung mittels Analysenautomat, jedoch deutlich unter den Kosten einer manuellen naßchemischen Einzelbestimmung, bei der natürlich auch der erforderliche Zeitaufwand in Betracht gezogen werden muß[60,66].

- Für Serienbestimmungen mit großer Serienlänge sind die Trockenchemiesysteme wenig geeignet, doch dafür sind zumindest die kleineren Geräte auch nicht konzipiert worden. (Mit dem KODAK EKTACHEM 400 und 700 Analyzer stehen Analysenautomaten zur Verfügung, die auf Trockenchemiebasis arbeiten.)

Abschließend möchte ich festhalten, daß das KODAK EKTACHEM DT60 Analysensystem für die rasche, zuverlässige, wirtschaftliche Einzelanalyse und Bestimmung kleiner Serien angelegt ist und daß es deshalb auch in der tiermedizinischen Labordiagnostik in diesem Sinne eingesetzt werden sollte. Es bietet sich besonders an für die Präsenzdiagnostik, wo eine patientenbezogene Analytik eine raschere, gezieltere Diagnosestellung erlaubt, die Notfalldiagnostik, bei der es auf die schnelle Bestimmung der wichtigsten Parameter ankommt und schließlich die Therapieüberwachung, bei der eine Erfolgskontrolle der gewählten Behandlungsmethode durch einzelne Laborwerte stattfindet.
Sicherlich stellt die selbst durchzuführende Trokkenlaboranalyse - unabhängig vom jeweiligen Trokkenchemiesystem - eine sinnvolle Alternative zu aufwendigen naßchemischen Bestimmungen wie auch zum Probenversand an Fremdlabors dar. Die mit Trokkenreagenzträgern arbeitenden Analysengeräte (Tischgeräte) dürften sich somit sowohl für Praktiker als auch für kleinere Tierkliniken eignen, die entweder bereits mit eigenem Labor arbeiten oder die die Labordiagnostik wieder in die eigene Praxis zurückholen wollen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

In einer klinischen Studie wurde der KODAK EKTACHEM DT60 Analyzer, ein kompaktes Tischgerät, das auf der Grundlage der Mehrschichten-Technologie arbeitet, auf seine Verwendbarkeit in der tierärztlichen Labordiagnostik untersucht.
In Serumproben von drei verschiedenen Tierarten (Hund, Katze und Pferd) gelangten über einen Zeitraum von sechs Monaten folgende Parameter zur Bestimmung: AST, ALT, CK, AP, LDH, GGT, α-Amylase, Gesamtbilirubin, Glucose, Harnstoff, Gesamteiweiß, Creatinin, Natrium und Kalium.
Die mit dem DT60 Analyzer erhaltenen Resultate wurden mit denjenigen, die ein HITACHI 705 Autoanalyzer bzw. ein Eppendorf Flammenphotometer lieferte, verglichen.

Die Ergebnisse der Präzisionsstudien (Präzision in der Serie und Präzision von Tag zu Tag) waren im allgemeinen sehr gut. Die Methodenvergleiche fielen durchaus zufriedenstellend aus. Abgesehen vom Natrium bestand bei allen Parametern eine hohe bis sehr hohe Korrelation. Die nicht immer gegebene gute Übereinstimmung der EKTACHEM-Werte mit den nach den Referenzmethoden gewonnenen Werten kann durch Einspeicherung entsprechender Korrekturfaktoren erzielt werden.

Das Analysengerät ist einfach zu bedienen und hat bewiesen, daß es zuverlässig arbeitet. Zusammenfassend ist zu sagen, daß es sicherlich erfolgreich zur Bestimmung von Serumanalyten bei Hunden, Katzen und Pferden eingesetzt werden kann.

S U M M A R Y

The KODAK EKTACHEM DT 60 dry-reagent system
Clinical study of its feasibility for laboratory diagnosis of dog, cat and horse

The KODAK EKTACHEM DT60 Analyzer, a compact table-top analyzer, which is based on the multilayer film technology, has been evaluated to assess its suitability for veterinary use.
Serum samples from three animal species (dog, cat and horse) were analyzed over a 6-month period for the following analytes: AST, ALT, CK, AP, LDH, GGT, α-amylase, total bilirubin, glucose, urea, total protein, creatinine, sodium and potassium.

Results obtained with the DT60 Analyzer were compared with those from a HITACHI 705 autoanalyzer respectively from an Eppendorf flame photometer.

Precision study results (within-run precision and between-run precision) were generally very good. Comparisons with other methods were quite satisfactory. Good to very good correlation was found for all the parameters, except for sodium. The agreement of the values measured by the EKTACHEM DT60 with those determined by reference methods was not always satisfactory but this is correctable.

The analyzer is easy to use and has proved to be reliable. So it can be concluded that it can be used successfully in the determination of serum-analytes in dogs, cats and horses.

VI. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1 BEDNAR,L.K.; KOCH,D.P.; QUAM,E.F.; KOCH,M.J.:
Clinical Laboratory Evaluation of the EKTACHEM DT60
Clin.Chem. 32,6; 1100 (1986); Abstr. 249

2 BEHRING - Publikation:
Qualitätskontrolle und Kontrollproben
Behringwerke AG, Frankfurt am Main (1982)

3 BOEHRINGER - Publikation:
Hitachi 705 - Geräteprospekt
Boehringer Mannheim GmbH (1985)

4 BOEHRINGER Testfibel:Alkalische Phosphatase opt.(1986)

5 " " :Bilirubin (1985)

6 " " :CK-NAC aktiviert (1986)

7 " " :Creatinin PAP (1986)

8 " " :Gesamt-Eiweiß (1986)

9 " " :Glucoquant® Glucose (1984)

10 " " :GOT opt. (1983)

11 " " :GPT opt. (1986)

12 " " :Harnstoff (1984)

13 BOEHRINGER Testfibel: LDH opt. (1986)
Boehringer Mannheim GmbH, Abt. Diagnostica

14 BURDICK,B.A.:
A Multilayer Element for Determining Urea Nitrogen in Whole Blood
Clin.Chem. 33,2; 310-311 (1987)

15 COSTELLO,P.; KUBASIK,N.P.; BRODY,B.B. et al.:
Multilayer Film Analysis:
Evaluation of Ion-Selective Electrolyte Slides
Clin.Chem. 29,1; 129-132 (1983)

16 CURME,H.G.; COLUMBUS,R.L.; DAPPEN,G.M. et al.:
Multilayer Film Elements for Clinical Analysis:
General Concepts
Clin.Chem. 24,8; 1335-1350 (1978)

17 CURME,H.G.; BABAOGLU,K.; BABB,B.E. et al.:
Single-Use Ion-Selective Electrodes:
General Concepts
Clin.Chem. 25,6; 115 (1979); Abstr. 262

18 DAPPEN,G.M.; WU,T.W.; HILL,D.E.:
Analytical Element for the Quantitative Determination of Total Serum Bilirubin
Clin.Chem. 26,7; 990 (1980); Abstr. 159

19 DAPPEN,G.M.; SUNDBERG,M.W.; WU,T.W. et al.:
A Diazo-Based Dry Film for Determination of Total Bilirubin in Serum
Clin.Chem. 29,1; 37-41 (1983)

20 DAPPEN,G.M.; GROSS,R.C.; SEARLE,R. et al.:
Development of a Thin-Film Assay for Glucose in Whole Blood
Clin.Chem. 32,6; 1101-1102 (1986); Abstr. 257

21 DROBNIES,A.; CLASPILL,R.:
Analysis of Fluids other than Serum, Urine or CSF by the KODAK EKTACHEM 700
Clin.Chem. 32,6; 1102 (1986); Abstr. 260

22 EIKENBERRY,J.N.; ERICKSON,W.F.; SANFORD,K.J. et al.:
Clinical Enzymes in a Dry, Thin-Film Format
Eastman Kodak Company, Rochester, N.Y.
(presented in the Kodak exhibit during the ASCP/CAP Annual Meeting, Miami Beach, Florida, October,1982)

23 EIKENBERRY,J.N.; SUTHERLAND,J.W.; SCHNIPELSKY,P.N.; SANFORD,K.J.:
Development of a KODAK EKTACHEM Clinical Chemistry Slide for Aspartate Aminotransferase
Clin.Chem. 29,6; 1247 (1983); Abstr. 515

24 EKTACHEM Alanine Aminotransferase Test Methodology
Publ.No. C-336 4/1986

25 " Alkaline Phosphate " "
Publ.No. C-337 4/1986

26 " Amylase " "
Publ.No. C-311 8/1985

27 " Aspartate Aminotransferase" "
Publ.No. C-338 4/1986

28	EKTACHEM	Creatine Kinase Publ.No. C-342 4/1986	Test	Methodology
29	"	Creatinine Publ.No. C-334 4/1986	"	"
30	"	γ-Glutamyltransferase Publ.No. C-343 4/1986	"	"
31	"	Glucose Publ.No. C-300 6/1985	"	"
32	"	Lactate Dehydrogenase Publ.No. C-344 4/1986	"	"
33	"	Potassium Publ.No. C-306 6/1985	"	"
34	"	Sodium Publ.No. C-307 6/1985	"	"
35	"	Total Bilirubin Publ.No. C-505 6/1985	"	"
36	"	Total Protein Publ.No. C-310 8/1985	"	"
37	"	Urea Nitrogen Publ.No. C-301 6/1985	"	"

Eastman Kodak Company, Rochester, N.Y.

38 EL-DERINY,S.; NG,R.N.; STATLAND,B.E.:
Evaluation of the KODAK EKTACHEM DT60 Analyzer
Clin.Chem. 32,7; 1415 (1986)

39 EMMONS,R.; AEBI,J.; JAMES,J.et al.:
Comparison of Animal Clinical Chemistry.
Results obtained from KODAK EKTACHEM 700 Analyzer
and Conventional Methods
Clin.Chem. 31; (1985)

40 EPPENDORF - Publikation:
Flammenphotometer FCM 6341 - Geräteprospekt

41 FREE,A.H.; FREE,H.M.:
Self Testing, An Emerging Component of Clinical
Chemistry
Clin.Chem. 30,6; 829-838 (1984)

42 GERARD,S.; KHAYAM-BASHI,H.:
Comparison of EKTACHEM 400 with Alkaline Picrate
Methods for the Measurement of Creatinine in
Ketotic Patients
Clin.Chem. 30,6; 968 (1984); Abstr. 143

43 GLICK,M.R.; RYDER,K.W.; JACKSON,S.A.:
Graphical Comparisons of Interferences in Clinical
Chemistry Instrumentation
Clin.Chem. 32,3; 470-475 (1986)

44 GREEN,G.; MEADOWS,K.; STANTON,C. et al.:
Performance of a Table-Top Clinical Chemistry
Analyzer, The KODAK EKTACHEM DT60 Analyzer
Clin.Chem. 30,6; 951 (1984); Abstr. 57

45 GRUBER,W.:
Dry Chemistry: First Results of Internal Development
Clin.Chem. 29,6; 1212 (1983); Abstr. 171

46 GUTMANN,J.; BERGMEYER,N.U. in:
H.U.BERGMEYER: Methoden der enzymatischen Analyse
3.Auflage, Bd.II
Verlag Chemie Weinheim, Bergstr. (1974)

47 HÄMMERLING,R.:
Wandel im Labor der Kleintierpraxis
Tierärztl.Prax. 14, 555-564 (1986)

48 HALLMANN,L.:
Klinische Chemie und Mikroskopie 11.Auflage
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1980)

49 HICKS,J.M.; JOSEFSOHN,M.:
Hemoglobin, Electrolytes and Other Major Clinical
Laboratory Analytes as Measured with a Physician's
Office Analyzer, the KODAK DT60
Clin.Chem. 32,12; 2201-2203 (1986)

50 HUTTON,P.S.; CONN,R.B.:
Interference by Hyperlipidemia:
A Comparison of Results Obtained on the EKTACHEM 400
and the ACA III or Astra -ε before and after Ultra-
centrifugation
Clin.Chem. 28,7; 1632 (1982); Abstr. 420

51 JACK,R.M.; NOBLE,W.:
Generation 04 Sodium Slides and Generation 04 Re-
ference Fluid Evaluated for Use with the EKTACHEM 400
Analyzer
Clin.Chem. 33,6; 845-847 (1987)

52 KÄHLER,W.M.:
Einführung in das Datenanalysensystem SPSS
(Eine Anleitung zur EDV-gestützten statistischen
Datenauswertung) 1.Auflage
Friedr. Vieweg & Sohn VerlagsGmbH, Braunschweig,
Wiesbaden (1984)

53 KAISER,R.E.; MÜHLBAUER,J.A.:
Elementare Tests zur Beurteilung von Meßdaten:
Soforthilfe für statistische Tests mit wenigen
Meßdaten 2.Auflage
Bibliographisches Institut, Mannheim, Wien, Zürich
(1983)
(B.I.Hochschultaschenbücher Band 774)

54 KODAK - Publikation:
Bedienungsanleitung f. KODAK EKTACHEM DT60
Eastman Kodak Co., Rochester (1984)

55 KODAK - Publikation:
KODAK EKTACHEM DT60 - Geräteprospekt
KODAK AG, Stuttgart (1986)

56 KRAFT,W.; DÜRR,U.M.:
Kompendium der klinischen Laboratoriumsdiagnostik
bei Hund, Katze und Pferd 2.Auflage
Schaper-Verlag, Hannover (1981)

57 KUBASIK,N.P.; WOODING LISUZZO,C.; SAME,D.G. et al.:
Multilayered Film Analysis:
Evaluation of Ammonia and Creatinine Slides
Clin.Biochem. 17; 15-18 (Febr. 1984)

58 LIBEER,J.C.:
Solid Phase Chemistry in Clinical Laboratory Tests: A Literature Review
J.Clin.Chem.Clin.Biochem. 23,10; 645-655 (1985)

59 LUTZ,H.; RUEDI,R.; FORRER,R. et al.:
Evaluation des Trockenchemie-Analysengerätes KODAK EKTACHEM DT60 bezüglich seiner Verwendbarkeit in der Veterinärmedizin
D.prakt.Tierarzt 69,2; 16-26 (1988)

60 MEDICAL TRIBUNE (Sonderdruck)
Laborwerte 5 Minuten nach Blutabnahme
Hausärzte testen 4 Geräte
MT Nr.26; 2-6 (6/1987)

61 NANJI,A.A.; SINCENNES,F.; POON,R.; HINBERG,J.:
Evaluation of the KODAK DT60 Analyzer
Clin.Chem. 33,7; 1255 (1987)

62 NORTON,G.E.; THUNBERG,A.L.; DAPPEN,G.L. et al.:
Development of KODAK EKTACHEM Clinical Chemistry Slide Assay for Alkaline Phosphatase
Clin.Chem. 29,6; 1269 (1983); Abstr. 259

63 NOVROS,J.; MAUCK,J.C.; MAUCK,L.; NORTON,G.E.:
Development of a Single Slide KODAK EKTACHEM Thin-Film Assay for Serum and Urine Creatinine
Clin.Chem. 32,6; 1197-1198 (1986); Abstr. 735

64 O'CONNOR,J.E.; RUETER,C.A.; STANTON,C.A.; LO,D.H.:
Thin-Film Enzyme Assays on the EKTACHEM 700 Analyzer avoid Interference by Lipemia, Hemolysis and Bilirubin
Clin.Chem. 31,6; 1007 (1985); Abstr. 548

65 PERSIJN,J.P.; VAN DER SLIK,W.:
A New Method for the Determination of γ-Glutamyltransferase in Serum
J.Clin.Chem.Clin.Biochem. 14; 421 (1976)

66 PLISCHKE,W.:
Kostenanalyse trockenchemischer Bestimmungen
Lab.med.8,9; 314-317 (1984)

67 PLISCHKE,W.:
Trockenchemie - die Methode der Zukunft
Der informierte Arzt 11,12; 3-11 (1983)

68 POWERS,D.M.; RAND,R.N.; BRODY, B.B.:
Analytical and Clinical Performance of KODAK EKTACHEM Thin Film Ion Selective Electrodes for Serum Na^+, K^+ and Cl^-
Clin.Chem. 26,7; 991 (1980); Abstr. 165

69 POWERS,D.; NOVROS,J.; EVANS,L.; GREENBERG,N.:
Efficiency of Pyridoxal-5-Phosphate Activation of AST and ALT in the KODAK EKTACHEM Slides compared with the JFCC Methods
Clin.Chem. 30,6; 1062 (1984); Abstr. 630

70 POWERS,D.M.; LONG,M.E.; VAN BRUNT,N.et al.:
Ninety-day Calibration Stability of KODAK EKTACHEM Analyzers: IMPLICATIONS for Quality Control
Clin.Chem. 31,6; 1016 (1985)

71 RADTKE,D.; KOHSE,K.P.; KNOLL,E.; WISSER,H.:
Evaluation der Mehrschichtentechnologie unter Verwendung von KODAK EKTACHEM Analyseplättchen für die Analyse von Substraten, Elektrolyten und Enzymen
Abt. für Klinische Chemie, Robert Bosch Krankenhaus Stuttgart (1986)

72 RICHTERICH,R.; COLOMBO,J.P.:
Klinische Chemie 4.Auflage
S.Karger Verlag, Basel (1978)

73 RONCHETTI,L.; GREEN,G.; STANTON,C.; SCHNIPELSKY,P.:
Grundlagen, Arbeitsweise und Leistung des KODAK EKTACHEM DT60 Analysegeräts
EASTMAN KODAK CO, Rochester, N.Y., USA
(präsentiert auf dem 2. International Congress on Automation and New Technologies in the Clinical Laboratory, Barcelona, Spanien, Oktober 1984)

74 SCHMIDT,F.H.:
Die enzymatische Bestimmung von Glucose und Fructose nebeneinander
Klin.Wschr. 39; 1244-1247 (1961)

75 SHIREY,T.L.:
Development of a Layered-Coating Technology for Clinical Chemistry
Clin.Biochem. 16,2; 147-155 (1983)

76 SHIREY,D.:
Veterinary Applications for EKTACHEM Analyzers
Eastman Kodak Co., Rochester (1986)

77 SHULL,R.M.:
Evaluation of Four Office Chemistry Systems for Veterinary Practice
American Animal Hospital Association (AAHA) Trends 22-26 (1985)

78 SIEDEL,J.; MÖLLERING,H.; ZIEGENHORN,J.:
Sensitive color reagent for the enzymic determination of creatinine
Clin.Chem. 30,; 968-969 (1984)

79 SMITH-LEWIS,M.J.; WEAVER,M.S.; VICKERS,R.S.:
Development of a KODAK EKTACHEM Clinical Chemistry Slide for Lactate Dehydrogenase
Clin.Chem. 29,6; 1168 (1983); Abstr. 63

80 SOMMER,H. et al.:
Einfluß von Temperatur und Lagerungsdauer auf Serumparameter
Diagnostica-Inf.f.d.Vet.med.8 (1983)

81 SPAYD,R.W.; BRUSCHI,B.; BURDICK,B.A. et al.:
Multilayer Film Elements for Clinical Analysis: Applications to Representative Chemical Determinations
Clin.Chem. 24,8; 1343-1350 (1978)

82 STÄHLER,F.:
Reflometrie - Möglichkeiten und Grenzen der sogenannten Trockenchemie
(Vortragsreihe anläßlich der Medica 1983)
Boehringer Mannheim GmbH (1984)

83 SUNDBERG,M.W.; BECKER,R.W.; ESDERS,T.W. et al.:
An Enzymic Creatinine Assay and a Direct Ammonia Assay in Coated Thin Films
Clin.Chem. 29,4; 645-649 (1983)

84 SZASZ,G.; PERSIJN,J.P. et al.:
New Substrates for Measuring γ-Glutamyltranspeptidase Activity
Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 12; 228 (1974)

85 THOMAS,L.:
Labor und Diagnose 2.Auflage
Med.Verlagsges. Marburg/Lahn (1984)

86 THOMAS,L.; APPEL,W.:
Trockenchemie: Bestimmung von Blutbestandteilen
Diagnostik 17,11; 22-24 (1984)

87 TOFFALETTI,J.; BLOSSER,N.; HALL,T. et al.:
An Automated Dry-Slide Enzymatic Method Evaluated for Measurement of Creatinine in Serum
Clin.Chem. 29,4; 684-687 (1983)

88 TRUCHAUD,A.; GOURMELIN,I.; BINISTI,J. et al.:
Evaluation of a New Table-Top Multiparametric Analyzer Using Dry Chemistry Technology
Clin.Chem. 32,6; 1120 (1986); Abstr. 350

89 TSCHUDI,P.:
Das Trockenchemie-System Seralyzer® und seine Verwendbarkeit in der tierärztlichen Praxis
Tierärztl.Prax. 13; 385-393 (1985)

90 WAHLEFELD,A.W. et al.:
Modification of the Malloy-Evelyn-Method for a Simple, Reliable Determination of Total Bilirubin in Serum
Scand.J.Clin.Lab.Invest. 39; Suppl.126 (1972)
Abstr. 11.12

91 WEICHSELBAUM,T.E.:
An Accurate and Rapid Method for the Determination of Proteins in Small Amounts of Blood Serum and Plasma
Amer.J.Clin.Path. 16; 40-49 (1946)

92 WEISS,J.S.; SUNDBERG,M.W.; DAPPEN,G.M. et al.:
Diazo-Based Assay for Total Bilirubin in a Coated Thin Film Evaluated
Clin.Chem. 30,8; 1310-1313 (1984)

93 WERNER,J.:
Medizinische Statistik
Eine praktische Anleitung für Studierende, Doktoranden, Ärzte und Biologen 1.Auflage
Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore (1984)

94 WISSER,H.; KNOLL,E.; RADTKE,D.:
Klinisch-chemische Routineanalytik mit vorgefertigten Reagenzträgern
J.Clin.Chem.Clin.Biochem. 24,2; 147-154 (1986)

95 ZOFEL,P.:
Statistik in der Praxis 1.Auflage
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1985)
(UTB 1293)

D A N K S A G U N G

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wilfried Kraft für die Überlassung des Themas, das kritische Interesse, mit dem er stets den Fortgang der Arbeit verfolgt hat, und seine freundliche Unterstützung.

Herrn Dr. J. Hirschberger danke ich recht herzlich für die wissenschaftliche Anleitung und seine jederzeit bereitwillig gewährte Hilfe.

Besonders danken möchte ich auch den Damen des Labors M. Brandt, M. Eidenschink, P. Koblofsky, E.Kuhnert und E. Weschta für die Unterstützung und gute Zusammenarbeit während der praktischen Tätigkeit zu dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. K. Osterkorn danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Der Firma Kodak, Stuttgart, danke ich für die kostenlose Bereitstellung des Testgerätes und aller notwendigen Materialien. Speziell den Herren Dr. F. Hafner, K. Appel und Ch. Heinrich gilt mein Dank für die freundliche Betreuung sowie die Erstellung der Graphiken.

Ganz herzlich möchte ich mich schließlich bei meiner Mutter bedanken, die durch die Übernahme der Schreibarbeiten wesentlich zur Fertigstellung der vorliegenden Arbeit beigetragen hat.

L E B E N S L A U F

Ulrike Ilse Scholz
Geboren am 8. Januar 1957 in Traunstein
Eltern: Dr. med. Wilhelm Scholz, Arzt
Gertrud Scholz, geb. Scholz, Apothekerin

Schulausbildung:

1963 - 1967	Volksschule in Traunstein
1967 - 1976	Annette-Kolb-Gymnasium in Traunstein
Juni 1976	Abitur

Universitätsausbildung:

ab WS 1976/77	Studium der Pharmazie an der Pharmazeutischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität in München
25. Februar 1982	Pharmazeutisches Staatsexamen
9. März 1982	Approbation als Apothekerin
ab WS 1981/82	Studium der Tiermedizin an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität in München
13. Januar 1987	Tierärztliches Staatsexamen
6. Februar 1987	Approbation als Tierärztin

Derzeitige Tätigkeit:

seit März 1987
Doktorandin an der I.Medizinischen Tierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität in München